



HAL
open science

PprA : une protéine clé dans la radiorésistance chez Deinococcus radiodurans

Alice Devigne

► **To cite this version:**

Alice Devigne. PprA : une protéine clé dans la radiorésistance chez *Deinococcus radiodurans*. Biologie moléculaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS056 . tel-01968008

HAL Id: tel-01968008

<https://theses.hal.science/tel-01968008>

Submitted on 2 Jan 2019

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.

NNT : 2015SACLS056

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE N°577
Structures et dynamique des systèmes vivants

Spécialité de doctorat : Science de la vie et de la santé

Par

Mme Alice DEVIGNE

PprA: une protéine clé de la radiorésistance chez la bactérie *Deinococcus radiodurans*

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 22 octobre 2015 :

Composition du Jury :

M. Nicolas Bayan, Professeur, Université Paris-Sud, Président du Jury
M. Marc Nadal, Professeur, Université Paris Diderot, Examineur
M. Olivier Espeli, Directeur de recherche, Collège de France, Examineur
Mme Joanna Timmins, Chargée de recherche CNRS, Rapporteur
M. Arjan de Groot, Chercheur CEA, Rapporteur
Mme Pascale Servant, Maître de conférences, Université Paris-Sud, Directeur de thèse



Comprendre le monde,
construire l'avenir®



UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 426 :
GÈNES GÉNOMES CELLULES

Laboratoire : *Radiorésistance des bactéries et des archées*
Institut de Biologie Intégrative de la Cellule

THÈSE DE DOCTORAT

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

par

Alice DEVIGNE

**PprA : une protéine clé de la radiorésistance chez la bactérie
*Deinococcus radiodurans***

Soutenue le 22 octobre 2015

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Pascale SERVANT	Maître de conférences, Université Paris-Sud
Rapporteurs :	Joanna TIMMINS Arjan DE GROOT	Chargée de recherche, CNRS Chercheur, CEA
Examineurs :	Olivier ESPELI Marc NADAL Nicolas BAYAN	Directeur de recherche, Collège de France Professeur, Université Paris Diderot Professeur, Université Paris-Sud



Comprendre le monde,
construire l'avenir®



UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 426 :
GÈNES GÉNOMES CELLULES

Laboratoire : *Radiorésistance des bactéries et des archées*
Institut de Biologie Intégrative de la Cellule

THÈSE DE DOCTORAT

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

par

Alice DEVIGNE

**PprA : une protéine clé de la radiorésistance chez la bactérie
*Deinococcus radiodurans***

Soutenue le 22 octobre 2015

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Pascale SERVANT	Maître de conférences, Université Paris-Sud
Rapporteurs :	Joanna TIMMINS Arjan DE GROOT	Chargée de recherche, CNRS Chercheur, CEA
Examineurs :	Olivier ESPELI Marc NADAL Nicolas BAYAN	Directeur de recherche, Collège de France Professeur, Université Paris Diderot Professeur, Université Paris-Sud

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de lire et examiner ma thèse. Merci à Joanna et Arjan d'avoir accepté d'être mes rapporteurs, à Olivier, Marc et Nicolas d'avoir accepté d'être mes examinateurs. Egalement merci à Marie-Claude Serre d'avoir été ma tutrice pendant ma thèse avec Olivier.

Merci Suzanne de m'avoir acceptée dans ton laboratoire dès mon stage de M2 et pour avoir été présente à la fin de la rédaction de ce manuscrit.

Merci Pascale, ma Directrice de thèse, pour m'avoir si bien encadrée, pour avoir été là pour moi le plus souvent possible. Merci à ta bonne humeur et ton optimisme constant qui ont pu me redonner le sourire dans les moments difficiles, tant sur le plan professionnel que personnel (Cet Indien nous aura eemm**** de A à Z au cours de ma thèse décidément...).

Merci à la petite Dame Claire, qui a bien supporté de m'avoir dans ses pattes à mon arrivée au laboratoire et qui m'a transmis ses connaissances qui m'ont permis ensuite d'être rapidement autonome. Merci aussi d'avoir été là quand ça n'allait pas fort. Nos discussions de « chats » me manqueront ! Caresses à tes Loulous !

Merci à ma CO-thésarde, ma COLLègue mais avant tout ma COpine, Solenne. On s'est serrées les coudes, embarquées dans le même bateau. Je suis contente d'avoir croisé ta route, d'avoir partagé tous ces moments avec toi, j'espère qu'il y en aura d'autres, au soleil et au bord de la mer si possible (sans les moustiques, sans les réactions étranges au soleil, sans les piratages de compte, mais avec de la Blue Moon !!!) !

Merci Fanny, pour tes conseils et petits trucs et astuces à la paillasse et pour les litres de thé engloutis à la cafèt !

Merci à tous les autres membres du labo, Cécile, Geneviève, Martine, pour m'avoir bien accueillie et endurée pendant cette thèse.

Je tiens aussi à remercier tous les gens de l'institut que j'ai pu croiser et avec qui j'ai pu interagir, Magalie pour son aide au microscope, Martine pour ses aides administratives, le groupe des « marrantes du bout du couloir », Jorge ma ptite cocotte,...

Merci aux étudiants iGEM qui j'ai encadré, en particulier ceux de la cuvée 2014-2015 qui ont bien pris soin de moi ces derniers temps d'écriture, m'ont donné à manger, chanté des

chansons et changé les idées ! Et merci aux autres encadrants de m'avoir fait partager cette aventure très enrichissante.

Merci aussi à ma petite famille d'avoir été présente et de m'avoir toujours soutenue, mes petits parents, mes petits grands parents et tontons et tatas.

Merci à toi mon Ptit Chlamy, je te mets dans la catégorie « Famille ». Tu as toujours été là, même à distance. Merci pour tous ces fous rires, ces bêtises faites dans ton quartier, ces petites semaines à la Palmyre, ton soutien sans faille dans n'importe quelle circonstance... Ton amitié m'est très précieuse, je remercie ces cours d'anglais nuls qui m'ont fait te rencontrer...

Merci à celui qui arrive à la fin de cette dernière année de thèse et qui n'est pas la plus simple, mais bon, mieux vaut tard que jamais ! Mon cher et tendre voisin de place de village surfer/runner/biker/snowborder...

Merci également à toutes les personnes que j'ai pu rencontrer tout au long de ma formation et qui m'ont poussée à aller plus loin. En particulier merci à mes professeurs de BTS qui m'ont fait aimer les « petites bêtes » et Mr Poisson avec qui j'ai fait mon premier stage de microbio et qui je pense a été le déclic. Merci Tonton Cricri et Tata Bleue pour m'avoir accueillie dans votre magasin et m'avoir sauvée la mise cette année là...

Le dernier « Merci » revient au principal intéressé, la star du labo, Mr *D. radiodurans*, charmante bête que j'ai aimé manipuler même s'il m'a donné du fil à retordre à certains moments et qui a bien accepté de se faire griller régulièrement pour le bien de la Science....

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
Liste des principales abréviations	4
Liste des figures et tableaux	5
Résumé	7
Summary	8
INTRODUCTION	9
I <i>Deinococcus radiodurans</i> : l'un des organismes les plus résistants aux agents endommageant l'ADN connus à ce jour	10
A -Présentation de l'organisme <i>D. radiodurans</i>	10
B -Organisation du génome.....	11
C -Résistance aux agents endommageant l'ADN	11
II Facteurs impliqués dans la radiorésistance	13
A -Protection contre l'oxydation.....	13
(1) Systèmes de défense enzymatique.....	14
(2) Systèmes de défense non enzymatiques	14
B -Structure du nucléoïde.....	16
C -Réparation des lésions de l'ADN	19
(1) Réparation et nettoyage des bases et nucléotides endommagés	19
(2) Mécanismes de réparation des cassures double brin de l'ADN	20
D -Régulation	26
E -Protéines spécifiques des <i>Deinococcaceae</i>	30
III Cycle cellulaire chez les bactéries	34
A -Réplication des chromosomes.....	34
(1) Réplication de l'ADN chez les eucaryotes et les bactéries.....	34
(2) Le chromosome bactérien et sa réplication.....	35

B -Coordination du cycle cellulaire et du cycle de réplication	36
IV Structure du chromosome bactérien.....	38
A -Les protéines NAP « Nucleoid Associated Proteins »	39
(1) Fis pour « Factor for Inversion Stimulation ».....	39
(2) IHF pour « Integration Host Factor »	40
(3) H-NS pour « Heat-stable Nucleoid-Structuring protein »	40
(4) HU pour «Heat-Unstable protein »	40
(5) Dps pour « DNA-binding Protein from Straved Cells ».....	40
B -Les protéines de la famille SMC	42
(1) Caractéristiques générales des protéines de la famille SMC (Structural Maintenance of Chromosome) et SMC-like	42
(2) Protéines de la sous famille Smc/MukB	44
(3) Protéines de la sous famille SbcC/Rad50	46
(4) Protéines de la sous famille RecN	47
(5) Chez <i>D. radiodurans</i>	48
C -Le surenroulement négatif.....	51
(1) Mode d'action des topoisomérases	51
(2) Le rôle biologique des topoisomérases	51
(3) ADN topoisomérase IV et ADN gyrase.....	53
(4) Les ADN topoisomérases chez <i>D. radiodurans</i>	55
V Ségrégation du chromosome bactérien.....	55
A -Ségrégation des origines de réplication	56
(1) Système parABS :	56
(2) Ségrégation par la force des ARN polymérase :	57
B -Ségrégation du corps du chromosome	57
(1) Compaction de l'ADN	57
(2) Cytosquelette MreB bactérien.....	58
(3) Expulsion par le réplisome :	58

C -Ségrégation du Terminus	59
D –Cas des organismes multi-chromosomiques	61
Problématique de la thèse.....	63
RESULTATS - DISCUSSION	65
Chapitre 1 :	66
La protéine PprA est nécessaire à la ségrégation des chromosomes après irradiation chez la bactérie <i>Deinococcus radiodurans</i>	66
Présentation de la problématique	67
Article 1.....	68
Chapitre 2 :	81
La protéine PprA est impliquée dans la ségrégation des chromosomes par interaction physique et fonctionnelle avec l’ADN gyrase chez la bactérie <i>Deinococcus radiodurans</i> après irradiation	81
Présentation de la problématique	82
Article 2.....	83
Chapitre 3 :	119
La délétion de <i>recN</i> supprime le phénotype sensible de la délétion <i>pprA</i> aux agents endommageant l’ADN testés	119
Présentation de la problématique	120
Résultats et discussion.....	121
Matériel & méthodes.....	136
CONCLUSION - PERSPECTIVES	142
Références Bibliographiques.....	147
Annexe	161

Liste des principales abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique

ARN: acide ribonucléique

ATP: adenosine tri-phosphate

BER: Base Excision Repair

DAPI: 4,6-diaminido-2-phenylindole dihydrochloride

ESDSA: Extended Synthesis Dependant Strand Annealing

FITC: fluorescéine

Gy: Gray

Kb: Kilobases

KGy: Kilogray

KOPS: FtsK Orienting Polar Sequences

MMR: mismatch repair

Mb: Megabase

NER: Nucleotide Excision Repair

NHEJ: Non Homologous End Joining

ORF: Open Reading Frame

RDR: Radiation Dessication Response

RDRM: Radiation Dessication Response Motif

ROS: Reactive Oxygen Species

SMC: Structural Maintenance of Chromosomes

SSA: Single Strand Annealing

UV: ultra violet

Liste des figures et tableaux

INTRODUCTION

Figure 1 : Morphologie de <i>D. radiodurans</i>	11
Figure 2 : Courbe de survie aux rayonnements γ de <i>Pyrococcus furiosus</i> , <i>Thermococcus gammatolerans</i> EJ3, <i>D. radiodurans</i> , <i>Halobacterium</i> NRC-1 et <i>E. coli</i> O157.....	12
Figure 3 : Cinétique de réparation des cassures de l'ADN après irradiation γ	12
Figure 4 : Réactions de détoxification des ROS dans les cellules.....	14
Figure 5 : Visualisation de l'oxydation des protéines induites par les rayonnements γ	15
Figure 6 : Structure du nucléoïde de <i>D. radiodurans</i> , <i>Rubrobacter radiotolerans</i> et <i>E. coli</i>	17
Figure 7 : Les différentes étapes de la réparation par recombinaison homologue.....	21
Figure 8 : Réparation des cassures double brin de l'ADN par ESDSA.....	22
Figure 9: Voies d'initiation de la réparation par recombinaison homologue chez <i>E. coli</i>	24
Figure 10 : Motif RDRM chez <i>D. radiodurans</i>	27
Figure 11 : Modèle de régulation du régulon RDR par DdrO et IrrE.....	29
Figure 12: Courbe de survie aux rayonnements γ de différents mutants de <i>D. radiodurans</i> ...	30
Figure 13: Modèle de réparation des cassures double brin de l'ADN par SSA et ESDSA.....	32
Figure 14: Réplication du chromosome d' <i>E.coli</i>	36
Figure 15 : Les systèmes Min et NO.....	38
Figure 16 : Organisation en domaines des protéines de la famille SMC.....	42
Figure 17 : L'hydrolyse de l'ATP modifie la structure des complexes formés par les protéines SMC et leurs protéines accessoires.....	43
Figure 18 : Interactions des complexes SMC avec l'ADN.....	43
Figure 19 : Architecture des complexes Smc et leurs protéines accessoires.....	44
Figure 20 : Coordination entre la décaténation et la ségrégation des chromosomes.....	45
Figure 21 : Complexe Smc eucaryote.....	45
Figure 22 : Architecture du complexe Rad50/Mre11.....	46
Figure 23 : Architecture et association de RecN.....	47
Figure 24 : Modèle du mode d'action de RecN.....	50
Figure 25 : Contraintes topologiques.....	52
Figure 26 : Ségrégation de la région terminus.....	60

RESULTATS-DISCUSSION

Figure 1 : Représentation schématique et vérification des homogénéisations	121
Figure 2 : Courbe de survie des souches de <i>D. radiodurans</i>	122
Figure 3 : Test de sensibilité aux inhibiteurs de l'ADN gyrase	124
Figure 4 : Test de sensibilité aux inhibiteurs de l'ADN gyrase	125
Figure 5 : Cinétique de réparation des cassures double brin de l'ADN.....	128
Figure 6 : Observation en microscopie à épifluorescence.....	131
Figure 7 : Courbe de survie des souches de <i>D. radiodurans</i>	132
Figure 8 : Western Blot des protéines PprA::HA et RecN::FLAG	133
Figure 9 : Observation en microscopie à épifluorescence.....	134
Tableau 1 : Protéines associées au nucléoïde chez <i>D. radiodurans</i> , <i>D. deserti</i> et <i>D. geothermalis</i>	41
Tableau 2 : Conservation des protéines impliquées dans la synthèse de la paroi, la ségrégation des chromosomes et la division cellulaire chez les organismes <i>B. subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. crescentus</i> et <i>D. radiodurans</i>	61

Résumé

Deinococcus radiodurans est l'un des organismes les plus radiorésistants connus à ce jour et de manière plus générale, présente une exceptionnelle tolérance aux agents qui endommagent son ADN. Cette bactérie est capable de reconstituer un génome intact à partir de centaines de fragments d'ADN engendrés par exposition aux radiations ionisantes.

Ce phénomène de radiorésistance est la conséquence d'une association de plusieurs mécanismes et facteurs agissant de concert lorsque les cellules sont soumises à ce type de rayonnement. Parmi ces facteurs identifiés, on peut citer la présence de certaines protéines spécifiques des *Deinococcaceae*.

Parmi elles, la protéine PprA joue un rôle important dans la radiorésistance de *D. radiodurans*. Cette protéine qui est fortement induite après irradiation n'a pas d'homologue chez des organismes autres que les *Deinococcaceae*. Pour essayer de comprendre le rôle de PprA dans la radiorésistance chez *D. radiodurans*, j'ai effectué une caractérisation approfondie du mutant de délétion $\Delta pprA$. Ce mutant est très sensible aux rayonnements γ ainsi qu'à d'autres agents qui créent des dommages sur l'ADN comme l'acide nalidixique et la novobiocine. L'étude morphologique de ce mutant et la localisation de la protéine *in vivo* après irradiation suggèrent que PprA est impliquée dans un mécanisme de ségrégation des chromosomes lors de la division, après irradiation lorsque l'ADN des cellules a été réparé.. L'étude du réseau d'interactants de PprA a révélé que cette protéine interagit *in vivo* avec l'ADN gyrase après irradiation et permet la stimulation de l'activité de décaténation de cette dernière sans influencer son activité de surenroulement négatif de l'ADN *in vitro*.

Les phénotypes observés précédemment ont également suggéré une éventuelle interaction entre PprA et les protéines de la famille SMC. Chez *D. radiodurans* les protéines de la famille SMC sont SMC, SbcC et RecN. De façon surprenante, la délétion du gène *recN* dans une souche $\Delta pprA$ supprime la sensibilité aux agents endommageant l'ADN observée dans la souche simple mutante $\Delta pprA$. Ces résultats suggèrent une interaction génétique entre les gènes *pprA* et *recN*, cependant, la nature précise du lien entre les deux protéines PprA et RecN reste à établir.

Summary

Deinococcus radiodurans, one of the most radioresistant organisms known to date is able to reconstruct an intact genome from hundreds of DNA fragments generated by γ -rays. More generally, this bacterium is also tolerant to other DNA-damaging agents.

This exceptional ability to overcome effects of ionizing radiations is due to a combination of several well regulated mechanisms and factors acting together when cells are exposed the radiations. Among these factors, some specific proteins of the *Deinococcaceae* family which are induced after irradiation can be observed.

The PprA protein is one of these specific proteins and has been shown to have an important role in radioresistance in *D. radiodurans*. This protein is one of the most induced after γ -rays treatment. None homologous protein have been identify for the PprA protein. Characteristics of the $\Delta pprA$ mutant were investigated in order to understand the involvement of PprA in radioresistance. This mutant is very sensitive to γ -rays and other DNA damaging agents as nalidixic acid or novobiocin. Phenotypic analyses of this mutant revealed that PprA protein seems to be implicated in chromosome segregation after irradiation when DNA is repaired in cells. Moreover, the PprA protein has been shown to interact *in vivo* with DNA gyrase after irradiation and to stimulate *in vitro* the decatenation activity of DNA gyrase, without affecting its DNA negative supercoiling activity.

Phenotypes previously observed also suggest a potential interaction between the PprA protein and the protein SMC family which are SMC, SbcC and RecN in *D. radiodurans*. Surprisingly, we found that disrupting *recN* gene in a $\Delta pprA$ strain abolish the sensitivity to DNA damaging agents observed in a $\Delta pprA$ strain. These results suggest that the two genes, *pprA* and *recN* interact but the accurate link between the two proteins PprA and RecN remains to be highlighted.

INTRODUCTION

I *Deinococcus radiodurans* : l'un des organismes les plus résistants aux agents endommageant l'ADN connus à ce jour

A -Présentation de l'organisme *D. radiodurans*

La bactérie *Deinococcus radiodurans* a été découverte en 1956 dans l'Oregon comme contaminant de viande « stérilisée » par exposition au rayonnement γ (Anderson *et al.*, 1956). Initialement, cette bactérie a été nommée *Micrococcus radiodurans* à cause de sa morphologie similaire à celle des membres du genre *Micrococcus*. Les études ultérieures ont montré que cette espèce appartenait à un nouveau genre qui a été nommé *Deinococcus*, le préfixe grec *deinos* signifiant « étrange, inhabituel » (Brooks & Murray, 1981). Les bactéries de cette famille sont retrouvées dans des environnements très variés allant de sources chaudes (Ferreira *et al.*, 1997), de zones désertiques (de Groot *et al.*, 2005, Rainey *et al.*, 2005), de rochers de l'océan Arctique (Hirsch *et al.*, 2004) ou dans le tractus intestinal de certains animaux (Shashidhar *et al.*, 2010). Plus de 60 espèces de bactéries de la famille des *Deinococcaceae* ont été identifiées à ce jour, et une vingtaine de génomes ont été séquencés ou sont en cours de séquençage (Gerber *et al.*, 2015). Les isolats ont été le plus fréquemment obtenus après sélection par exposition à de fortes doses d'irradiation d'échantillons de terre, de sable, de produits alimentaires, d'instruments médicaux ou de textiles (Anderson *et al.*, 1956, Ferreira *et al.*, 1997, Hirsch *et al.*, 2004, Rainey *et al.*, 2005, de Groot *et al.*, 2005, Suresh *et al.*, 2004). La bactérie *D. radiodurans* est rattachée au phylum Deinococcus-Thermus dans lequel on retrouve par exemple les bactéries *Thermus thermophilus* ou *Thermus aquaticus* (Griffiths & Gupta, 2007) qui ne sont pas résistantes aux radiations. *D. radiodurans* est une bactérie en forme de coque d'environ 1 μm de diamètre et se révèle positive à la coloration de Gram, bien que la composition de son enveloppe cellulaire s'apparente davantage à celle des bactéries à Gram négatif. Elle possède en effet une fine couche de peptidoglycane et une membrane externe de composition lipidique originale puisqu'elle contient de la L-ornithine) (Rothfuss *et al.*, 2006). C'est une bactérie non motile, non sporulante et non identifiée comme pathogène. Elle produit un pigment de la famille des carotènes qui donne une couleur orange rosée aux colonies en culture sur boîte et aux cultures liquides. C'est une espèce mésophile qui se cultive préférentiellement à +30°C en condition

aérobie où son temps de génération est de 80 min en milieu riche. Lorsqu'elle est cultivée en milieu liquide, elle forme des diplocoques et des tétrades résultant de deux divisions cellulaires successives dans deux plans distincts de l'espace (**Figure 1**).

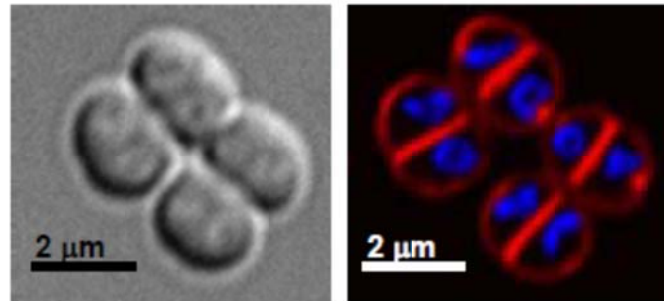


Figure 1 : Morphologie de *D. radiodurans* (forme en tétrade).

B -Organisation du génome

Le génome de *D. radiodurans* a une taille de 3.28 Mpb et se répartit en 2 chromosomes (2.64 Mpb et 412 Kpb), 1 mégaplasmide (177 Kpb) et 1 plasmide (45 Kpb) (White *et al.*, 1999). Le séquençage du génome de *D. radiodurans* a permis d'identifier 3187 phases ouvertes de lectures (ORF). Son génome possède un fort pourcentage en GC de 66.6%. Parmi ces 3187 ORF, seulement 2185 possèdent des homologues chez d'autres organismes. Cet organisme a la particularité de posséder un génome multi copie, ainsi chaque cellule peut contenir 4 à 10 copies équivalent génome dont la stœchiométrie des 4 éléments qui le composent est de 1/1/1/1 (Harsojo *et al.*, 1981, Hansen, 1978, Passot *et al.*, 2015). Cependant, la souche séquencée ne correspond pas à celle utilisée au laboratoire (souche R1, ATCC 13989). Récemment le laboratoire a donc mis en place une collaboration afin d'effectuer un séquençage du génome de la souche R1 de référence utilisée au laboratoire et une nouvelle annotation du génome est en cours.

C -Résistance aux agents endommageant l'ADN

La bactérie *D. radiodurans* est surtout connue pour sa résistance exceptionnelle aux agents qui endommagent l'ADN, en particulier les radiations ionisantes. Sa viabilité n'est pas affectée par une exposition à une dose de 6800 Grays (Gy) de rayonnement γ alors que des bactéries modèles telles *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis* voient leur survie diminuer dès

qu'elles sont exposées à des doses de radiations de quelques centaines de Grays (Blasius *et al.*, 2008) (Figure 2).

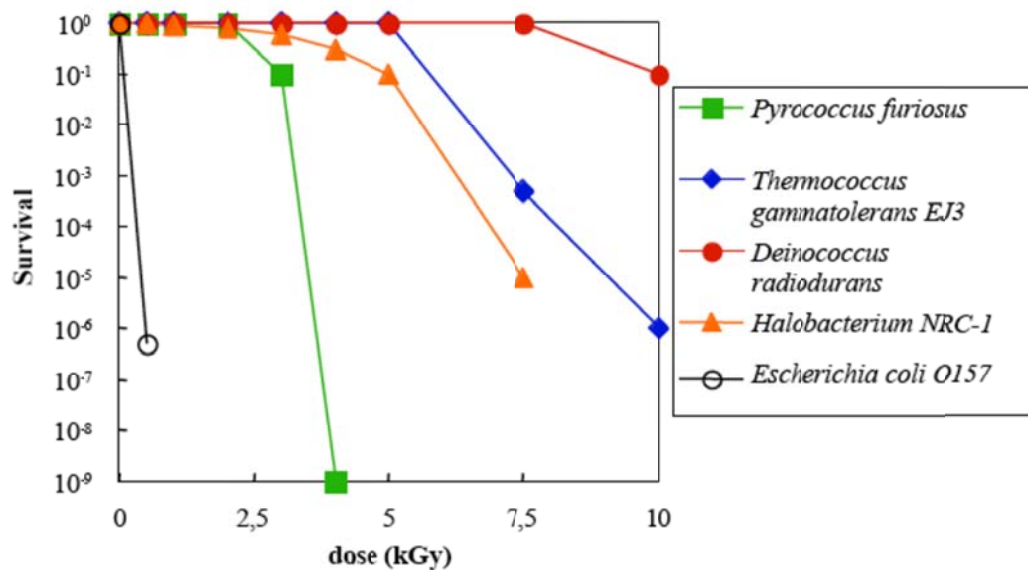


Figure 2 : Courbe de survie aux rayonnements γ de *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus gammatolerans EJ3*, *D. radiodurans*, *Halobacterium NRC-1* et *E. coli O157* (Confalonieri & Sommer, 2011).

Une exposition à une dose de 6800 Gy de rayonnement γ engendre environ 200 cassures double brin, 3000 cassures simple brin de l'ADN et plus de 1000 bases endommagées par équivalent génome. Les cellules endommagées de *D. radiodurans* une fois remises en culture, reconstituent en quelques heures un génome intact à partir de centaines de fragments d'ADN (Figure 3).

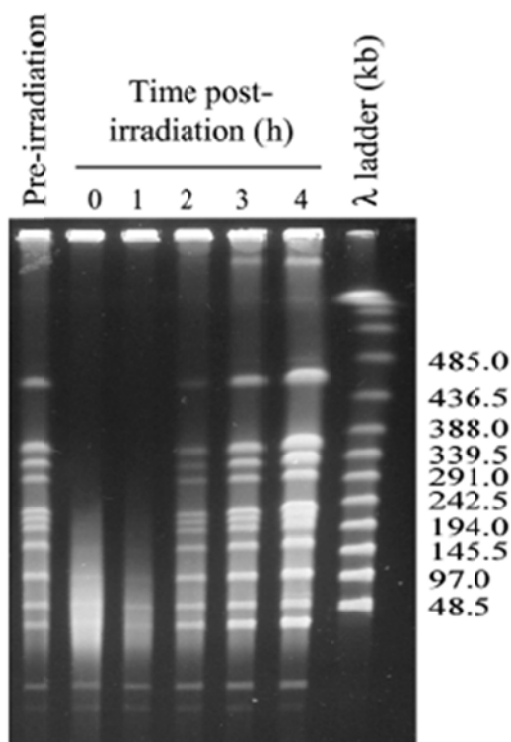


Figure 3 : Cinétique de réparation des cassures de l'ADN après irradiation γ (Blasius *et al.*, 2008). Les cellules sont irradiées à 6800 Gy puis remises en culture. Des prélèvements sont effectués à différents temps après irradiation, l'ADN est digéré par l'enzyme de restriction *NotI* puis est mis à migrer en électrophorèse en champ pulsé.

Il est important de noter que la bactérie *D. radiodurans* ne résiste pas aux radiations du fait d'une protection particulière de son ADN qui limiterait le nombre de dommages provoqués par les radiations. En effet, Gérard et ses collaborateurs ont montré dans l'équipe dirigée par Patrick Forterre que le nombre de cassures de l'ADN est identique chez *E. coli* et chez *D. radiodurans* lorsque ces bactéries sont exposées à la même dose de radiations (Gerard *et al.*, 2001). *D. radiodurans* est également très résistante à la dessiccation, elle peut en effet survivre pendant 6 semaines dans des conditions d'humidité inférieures à 5% (Mattimore & Battista, 1996). De telles conditions d'humidité provoquent la dénaturation de protéines dans les cellules, la formation d'espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species ou ROS) et également la formation de cassures double brin de l'ADN. *D. radiodurans* est également résistante aux UV-C qui induisent des dimères de pyrimidines, à la mitomycine C qui réagit avec les guanines pour former des pontages inter et intra brins. Enfin, elle est résistante à différents types de dommages touchant les bases de l'ADN induites par des produits chimiques comme des alkylations, des déaminations ou encore des oxydations.

II Facteurs impliqués dans la radiorésistance

Les rayonnements γ provoquent de nombreux dommages dans les cellules, de façon directe ou indirecte. Le phénomène de radiorésistance ne réside pas en un seul et unique mécanisme mais en une combinaison de plusieurs mécanismes efficaces, agissant de concert et à différents niveaux dans la cellule et les mécanismes mis en jeu sont spécifiquement adaptés aux dommages rencontrés.

A -Protection contre l'oxydation

L'exposition des cellules aux radiations ionisantes engendre, par ionisation de l'eau la formation de ROS se présentant sous 3 formes principales : les radicaux hydroxyles $\text{OH}\cdot$, les radicaux superoxydes $\text{O}_2\cdot^-$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . En présence de H_2O_2 , le fer ferreux Fe^{2+} est oxydé et conduit également à la formation de radicaux hydroxydes $\text{OH}\cdot$ (réaction de Fenton : $(\text{Fe}^{2+}_{\text{(aq)}} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+}_{\text{(aq)}} + \text{OH}^-_{\text{(aq)}} + \cdot\text{OH})$). Ces ROS ont pour cible une grande partie des constituants cellulaires, en particulier les protéines, les lipides, les

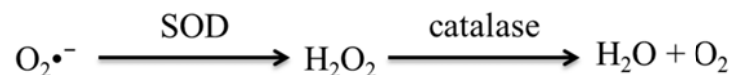
ARNs et l'ADN. Ces dommages sont très délétères pour la cellule. Des mécanismes de protection contre les ROS et le stress oxydatif sont présents chez tous les organismes (**Figure 4**).

D. radiodurans possède différents mécanismes de défense contre les ROS qui font intervenir des processus enzymatiques et non enzymatiques.

(1) Systèmes de défense enzymatique

D. radiodurans dispose d'une panoplie d'enzymes capables de nettoyer la cellule des ROS. Trois catalases, 4 superoxyde dismutases (SOD) et 2 peroxydases assurent le nettoyage des 3 principales formes des ROS dans la cellule (**Figure 4**).

A- Détoxification par les superoxydes dismutases et catalases



B- Rôle du manganèse dans la détoxification



C- Rôle du β -carotène dans la détoxification



Figure 4 : Réactions de détoxification des ROS dans les cellules

L'enzyme thioredoxine réductase est également impliquée dans la protection des protéines contre le stress oxydatif. Cette enzyme permet de restaurer une forme non oxydée de la thioredoxine qui réduit les cystéines oxydées dans les protéines.

(2) Systèmes de défense non enzymatiques

La cellule fait également intervenir des mécanismes non enzymatiques pour le nettoyage des ROS.

- **Les protéines Dps** : *D. radiodurans* exprime 2 protéines Dps (Dps1 et Dps2) qui protègent l'ADN des clivages provoqués par les radicaux hydroxyles $\text{OH}\bullet$. Chez *E. coli*, la protéine Dps a la propriété de chélater les ions Fe^{2+} et de réduire l' H_2O_2 en H_2O , empêchant la réaction de

Fenton qui engendre des radicaux hydroxyyles OH• (Almiron *et al.*, 1992, Martinez & Kolter, 1997).

- **Les β carotènes** : le pigment rose synthétisé par *D. radiodurans*, la deinoxanthine appartient à la famille des caroténoïdes. Treize gènes sont impliqués dans la biosynthèse des caroténoïdes chez *D. radiodurans* (Makarova *et al.*, 2001). Des mutants de la voie de biosynthèse de la deinoxanthine sont plus sensibles à différents agents qui endommagent l'ADN (rayonnements γ , H₂O₂, mitomycine C) (Zhang *et al.*, 2007). Il a également été montré que la deinoxanthine est capable d'inhiber l'oxydation des protéines *in vitro* plus efficacement que d'autres caroténoïdes (Tian *et al.*, 2009).

- **Un ratio [Mn/Fe] élevé** : les travaux des équipes de Michael Daly aux USA et de Miroslav Radman à Paris ont montré que les bactéries radiorésistantes possèdent des systèmes de protection particulièrement efficaces contre l'oxydation des protéines (Daly *et al.*, 2007, Krisko & Radman, 2010) (**Figure 5**).

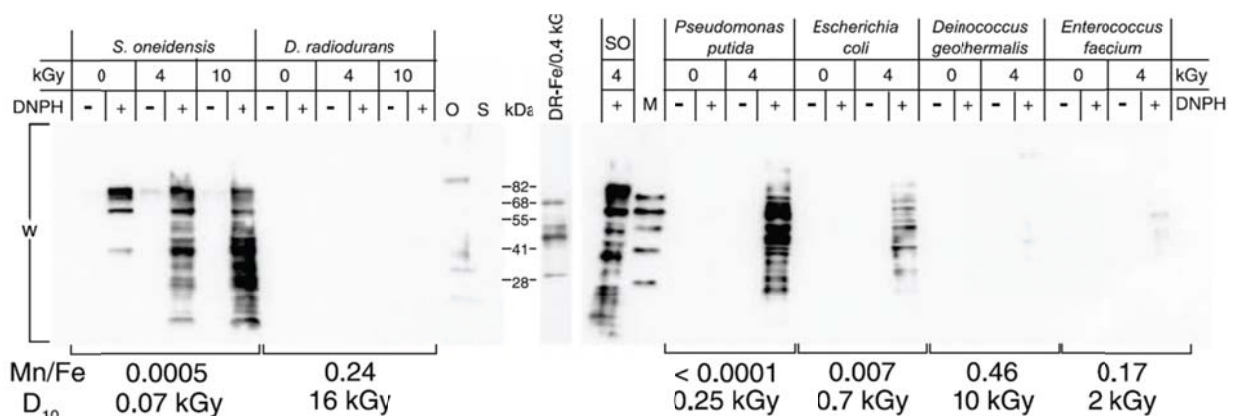


Figure 5 : Visualisation de l'oxydation des protéines induites par les rayonnements γ par Western Blot pour les espèces bactériennes *Shewanella oneidensis*, *D. radiodurans*, *Pseudomonas putida*, *E. coli*, *Deinococcus geothermalis* et *Enterococcus faecium* (Daly *et al.*, 2007). Les anti-corps primaires utilisés sont dirigés contre les groupements carbonyles, qui ont été préalablement traités par la 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH).

Les ions Mn²⁺ associés à du phosphate ont la capacité de nettoyer la cellule des radicaux superoxydes O₂•⁻ et donc de limiter la réaction de Fenton. Lorsqu'ils sont associés à des acides aminés/peptides ou du bicarbonate, ils peuvent éliminer l'H₂O₂ *in vitro*. Le Mn²⁺ peut également remplacer le Fe²⁺ associé à certaines enzymes, évitant ainsi leur oxydation. Chez *D. radiodurans*, la majorité du manganèse intracellulaire est sous forme de petits complexes associés à des orthophosphates et peptides (Daly *et al.*, 2007, Daly *et al.*, 2010). Il a été

montré que les extraits cellulaires de *D. radiodurans* sont enrichis en petites molécules radioprotectrices (Mn^{2+} , orthophosphate, peptides, nucléosides) en comparaison avec les extraits préparés à partir de bactéries radiosensibles. De plus, lorsque les extraits purifiés à partir de *D. radiodurans* sont ajoutés à des milieux de culture de cellules humaines ou d'*E. coli*, il a été observé une augmentation de leur survie suite à une exposition à des rayonnements ionisants (Daly *et al.*, 2010).

Même si les protéines sont en partie protégées de l'oxydation, l'existence d'un système efficace de traitement des protéines endommagées peut avoir un effet complémentaire et contribuer à la radiorésistance. Le génome de *D. radiodurans* possède un nombre élevé de protéases putatives (Makarova *et al.*, 2001) dont plusieurs sont induites après irradiation (Tanaka *et al.*, 2004). Une dégradation importante des protéines a été observée après irradiation γ (Joshi *et al.*, 2004). Chez de nombreuses bactéries, la protéolyse cellulaire est prise en charge par les protéases de la famille Clp et Lon. Ces protéines sont aussi impliquées dans la dégradation de régulateurs clés permettant aux bactéries de survivre à différents stress comme le choc thermique, les dommages de l'ADN ou encore le stress oxydatif (Hengge & Bukau, 2003, Gottesman, 2003). Chez *D. radiodurans*, la protéase ClpPX joue un rôle crucial après endommagement de l'ADN en régulant la reprise de la division cellulaire (Servant *et al.*, 2007). Les protéases Lon1 et Lon2 jouent un rôle important dans la prise en charge des protéines tronquées ou mal repliées (Servant *et al.*, 2007) mais ne semblent pas être impliquées dans la dégradation des protéines après irradiation. De plus, l'expression de plusieurs protéines chaperonnes est induite après irradiation (Tanaka *et al.*, 2004) et elles pourraient prendre en charge le repliement des protéines dont la conformation a été altérée.

B -Structure du nucléoïde

Il a été proposé que la structure du nucléoïde de *D. radiodurans* participe à la radiorésistance de cette bactérie. Les travaux publiés en 2003 par Levin-Zaidman (Levin-Zaidman *et al.*, 2003) suggéraient qu'une structure particulière du nucléoïde de *D. radiodurans* pourrait être la clé de cette radiorésistance. En effet, des observations de *D. radiodurans* par microscopie électronique ont mis en évidence une structure particulièrement compacte en forme d'anneau du nucléoïde conservée après irradiation. Le fait que l'ADN ne

diffuse pas dans la cellule après irradiation a permis aux auteurs de proposer que le maintien de la structure en anneau évitait la dispersion des fragments et assurait leur cohésion après irradiation facilitant ainsi une réparation des cassures de l'ADN par recollement des extrémités à l'aide d'une ADN ligase (Levin-Zaidman *et al.*, 2003). En 2005, Zimmerman et Battista (Zimmerman & Battista, 2005) ont confirmé par microscopie à épifluorescence que les bactéries radorésistantes possèdent un nucléoïde plus compact que les bactéries radiosensibles mais la structure du nucléoïde en forme d'anneau n'est pas conservée dans les bactéries radorésistantes (**Figure 6**).

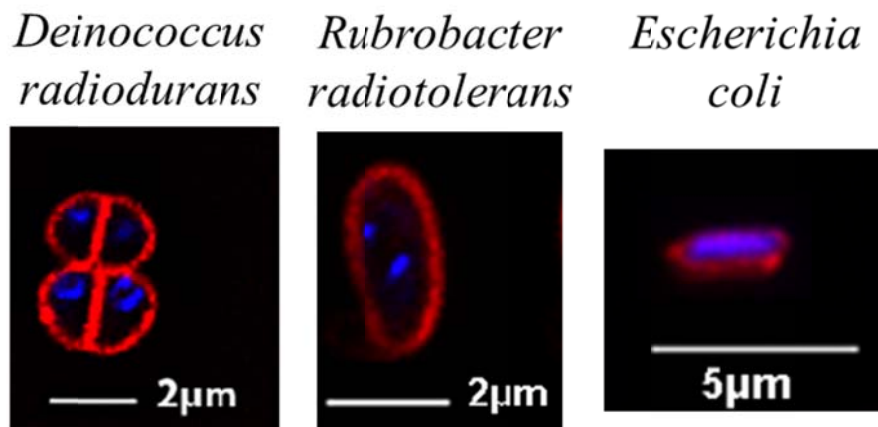


Figure 6 : Structure du nucléoïde de *D. radiodurans*, *Rubrobacter radiotolerans* et *E. coli*. L'ADN est coloré au DAPI et apparaît bleu, les membranes sont colorées au FM-4-64 et apparaissent rouges (Zimmerman & Battista, 2005).

La structure du nucléoïde en anneau observée chez *D. radiodurans* n'est donc pas essentielle pour la radorésistance. Des études effectuées dans notre laboratoire ont visé à identifier par des approches protéomiques les protéines présentes dans le nucléoïde de *D. radiodurans*. Ces travaux ont montré que la protéine HU et l'ADN gyrase sont les protéines majeures du nucléoïde de *D. radiodurans* (Touaille *et al.*, 2012). La protéine HU de *D. radiodurans* est une protéine essentielle à la viabilité de la bactérie et sa déplétion progressive provoque une décondensation de l'ADN et un fractionnement du nucléoïde qui conduit à la mort des cellules (Nguyen *et al.*, 2009). Chez *E. coli*, la protéine Dps est responsable de la compaction du nucléoïde en phase stationnaire ou en conditions de stress (Almiron *et al.*, 1992, Martinez & Kolter, 1997). La protéine Dps1 de *D. radiodurans* a la capacité de compacter l'ADN *in vitro* (Bhattacharyya & Grove, 2007), mais la délétion du gène *dps1* n'a pas d'effet visible sur la compaction du nucléoïde ni sur la radorésistance (Nguyen *et al.*, 2009). De plus, un double mutant $\Delta dps1 \Delta dps2$ présente la même radorésistance et la même compaction du nucléoïde

qu'une souche sauvage (Nguyen *et al.*, 2009). Les protéines SMC et MukB jouent un rôle important dans la ségrégation des chromosomes chez *B. subtilis* et *E. coli* respectivement (Yamanaka *et al.*, 1996, Graumann *et al.*, 1998). L'analogue fonctionnel de ces protéines chez *D. radiodurans* est Smc. Le laboratoire a montré que la protéine Smc de *D. radiodurans* n'est pas indispensable et son absence n'entraîne pas de phénotype particulier (Bouthier de la Tour *et al.*, 2009).

Une autre hypothèse a été mise en avant pour rendre compte de la radiorésistance de *D. radiodurans*. Le génome de *D. radiodurans* est constitué de 2 chromosomes, d'un mégaplasmide et d'un plasmide présent en 4 à 10 copies par cellule en fonction des conditions de culture (Harsojo *et al.*, 1981, Hansen, 1978, Passot *et al.*, 2015). Il a donc été proposé que la polyploïdie soit un élément déterminant de la radiorésistance. Battista et ses collaborateurs ont pu montrer que la présence de 2 équivalents génomes est nécessaire pour assurer la radiorésistance mais la radiorésistance n'augmente pas en fonction du nombre de copies du génome (communication personnelle de John Battista). La polyploïdie n'est donc pas la clé de la radiorésistance. On peut d'ailleurs noter que *Azotobacter vinlandii* qui peut accumuler jusqu'à 100 copies de génome par cellule est une bactérie radiosensible (Maldonado *et al.*, 1994).

Plusieurs mécanismes de réparation des cassures de l'ADN nécessitent une étape de recherche d'homologie et d'appariement homologue (voir plus loin). Il a été proposé qu'un pré-alignement des chromosomes en juxtaposant les régions homologues des différentes copies des chromosomes pourrait faciliter la recherche d'homologie (Minton, 1994, Minton & Daly, 1995). Des travaux récents menés au laboratoire par visualisation de plusieurs loci chromosomiques localisés sur le chromosome 1 de *D. radiodurans* montrent clairement que les loci homologues sont dispersés dans le nucléoïde et ne sont pas préalignés (Passot *et al.*, 2015). Après irradiation, il y a une réorganisation du nucléoïde avec un alignement transitoire des loci dans les temps tardifs de la réparation de l'ADN. Il est également observé une ségrégation retardée du locus Ter (Passot *et al.*, 2015). Ces expériences réfutent clairement l'hypothèse d'un pré-alignement des chromosomes comme étant un facteur clé de la radiorésistance chez la bactérie *D. radiodurans*.

C -Réparation des lésions de l'ADN

Les lésions des bases et nucléotides de l'ADN provoquées par les agents génotoxiques sont très diverses. Pour préserver l'intégrité de l'ADN, il existe plusieurs voies de réparation de ces lésions spécifiques ou non, des différents types de lésions rencontrées.

(1) Réparation et nettoyage des bases et nucléotides endommagés

(1-1) La réparation par excision de base (ou BER pour Base Excision Repair) fait intervenir des glycosylases qui reconnaissent spécifiquement et excisent un type de bases altérées. Une endonucléase clive le squelette sucre-phosphate puis le déoxyribose est éliminé, laissant une brèche dans la molécule d'ADN. Dans ce mécanisme, les brèches sont comblées par une ADN polymérase (qui est la PolI chez *E. coli*) et une ligase. Chez *D. radiodurans* on retrouve onze glycosylases identifiées et impliquées dans le système de réparation BER (Slade & Radman, 2011).

(1-2) La réparation par excision de nucléotides (ou NER pour Nucleotide Excision Repair) implique le complexe UvrAB qui reconnaît les déformations de la double hélice d'ADN. La protéine UvrC incise le brin d'ADN endommagé, de part et d'autre de la lésion et UvrD élimine le fragment incisé. Ce mécanisme intervient notamment après exposition des cellules aux rayonnements UV qui créent des dimères de pyrimidines qui engendrent des torsions et déformations de la double hélice d'ADN.

(1-3) Le système de réparation des mésappariements (ou MMR pour mismatch repair) reconnaît les bases mal appariées et participe à la fidélité de la réplication de l'ADN. *D. radiodurans* code les protéines MutS et MutL, responsables de la reconnaissance des mésappariements (Mennecier *et al.*, 2004), par contre aucun homologue de l'endonucléase MutH n'a été retrouvé chez cet organisme.

(1-4) Nettoyage des molécules endommagées : Pour la cellule, il est primordial d'éliminer les molécules endommagées. Les processus mis en place pour leur élimination dépendent de la nature des molécules. Les « oligonucléotides » (grands fragments d'ADN) qui portent des lésions sont dégradés et exportés hors de la cellule (Vukovic-Nagy *et al.*, 1974). Chez *D. radiodurans*, la protéine UvrA2 pourrait jouer un rôle dans ce processus (White *et al.*, 1999). Les nucléotides sont détoxifiés et recyclés par les protéines de la famille Nudix hydrolase

(elles sont au nombre de 23 chez *D. radiodurans* dont 5 sont induites après irradiation) et des nucléotidases (Bessman *et al.*, 1996, Xu *et al.*, 2001, Slade & Radman, 2011).

(2) Mécanismes de réparation des cassures double brin de l'ADN

Les rayonnements ionisants provoquent des cassures double brin de l'ADN, lésions qui sont considérées comme les plus redoutables pour la cellule sur le plan génotoxique. Il existe 4 grands mécanismes qui permettent de réparer ces lésions : la recombinaison homologue, l'appariement simple brin dépendant d'une synthèse massive d'ADN (ESDSA= Extended Synthesis-Dependent Strand Annealing), l'appariement simple brin (SSA=Single Strand Annealing) et le recollement des extrémités non homologues (NHEJ=Non Homologous End Joining)

(2-1) Recombinaison homologue et ESDSA

-La recombinaison homologue : est un mécanisme majeur de réparation des cassures de l'ADN chez les bactéries mais également chez les eucaryotes en phase G2 ou en phase S. Elle permet une réparation fidèle des cassures de l'ADN en utilisant un ADN intact homologue à celui qui est lésé. Ce mécanisme implique un échange de brins entre deux régions d'ADN homologues et peut être divisé en trois phases : (1) la phase d'initiation permet le chargement et la formation du nucléofilament RecA sur un ADN simple brin. (2) la recherche d'homologie et l'invasion de brin suivie de l'extension de l'ADN hétéroduplex par migration des jonctions de Holliday. (3) l'étape finale du processus de recombinaison homologue est la résolution des jonctions de Holliday. Une ADN polymérase est nécessaire au comblement des brèches et le produit final de la recombinaison sera obtenu après action d'une ligase (**Figure 7**).

Un autre mécanisme, l'ESDSA fait également appel à l'envahissement d'une région double brin homologue par un ADN simple brin couvert de RecA. Ce mécanisme mis en évidence chez *D. radiodurans* en 2006 implique une synthèse massive d'ADN, l'ADN simple brin envahissant servant d'amorce pour cette synthèse (Zahradka *et al.*, 2006).

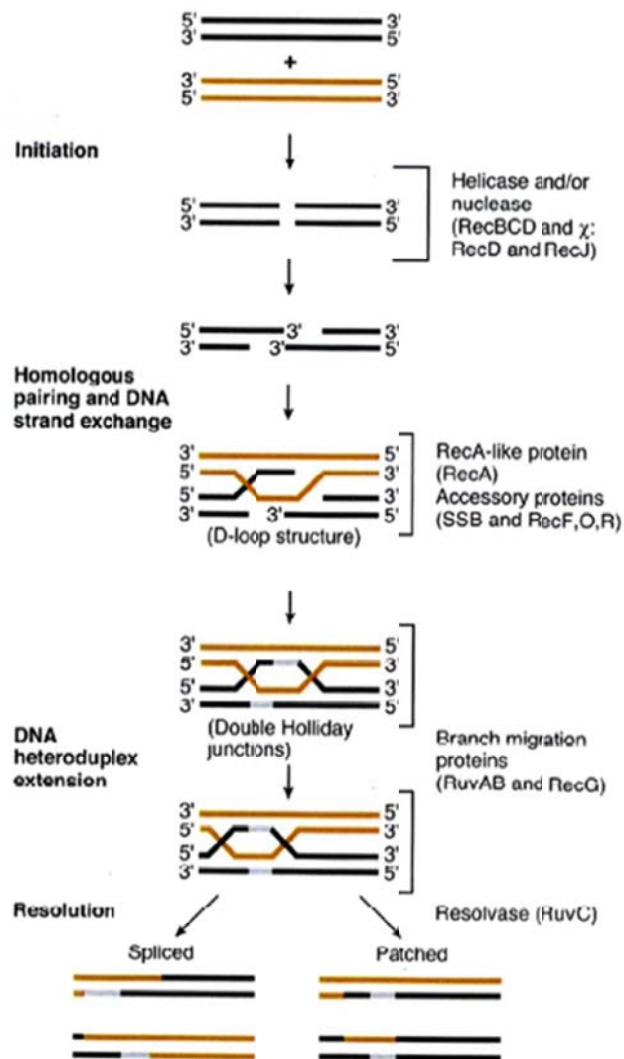


Figure 7 : Les différentes étapes de la réparation par recombinaison homologue. La phase d'initiation permet le chargement de la protéine RecA sur un ADN simple brin. Ce nucléofilament ADN/RecA « recherche » les homologues sur un autre ADN, étape suivie par l'invasion de cet hétéroduplex d'ADN par le nucléofilament puis migration des jonctions de Holliday. Le processus se termine par la résolution des jonctions de Holliday [Adapté de (Kowalczykowski, 2000)].

-L'ESDSA: Le brin néo-synthétisé sera ensuite déplacé et formera une longue extension simple brin, pouvant atteindre quelques dizaines de Kb. Cette extension simple brin peut ensuite s'apparier avec un ADN complémentaire généré également par ESDSA et aboutir au fil des appariements à des fragments de plus en plus longs. Ce mécanisme, qui est RecA dépendant, est caractérisé par une synthèse massive d'ADN impliquant les ADN polymérases III et I (Slade *et al.*, 2009). Le génome est reconstitué sous forme d'un patchwork de régions présentes avant irradiation et de régions néosynthétisées. Les chromosomes circulaires sont enfin reconstitués par recombinaison homologue faisant intervenir RecA (**Figure 8**).

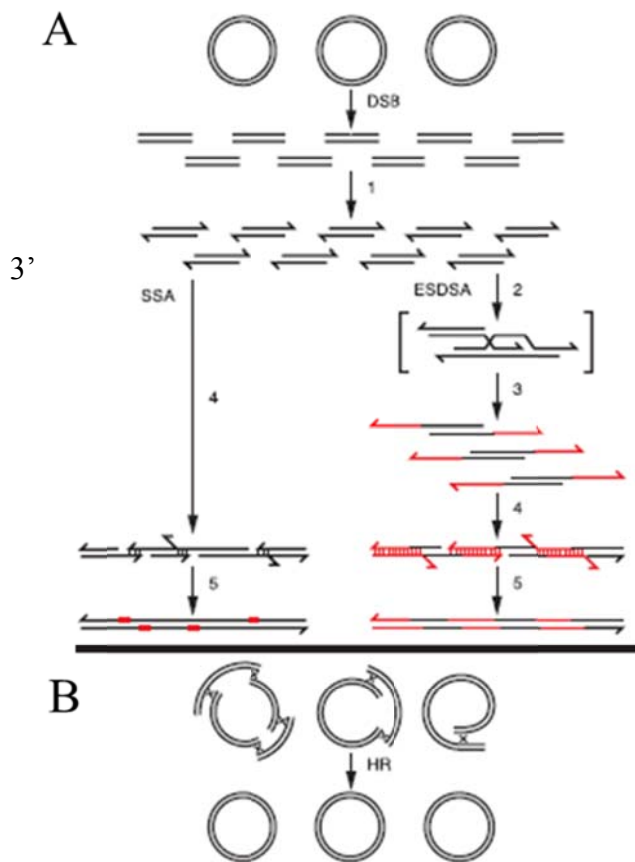


Figure 8 : Réparation des cassures double brin de l'ADN par ESDSA. (A) : première étape : Maturation des extrémités double brin par digestion partielle par des nucléases pour la génération des extrémités simple brin. Ces extrémités envahissent un ADN double brin homologue qui sert de matrice. Les ADN simple brin envahissants servent d'amorce pour initier la synthèse d'ADN. L'appariement des ADN simple brin nouvellement synthétisés (rouge) permet l'assemblage de longs intermédiaires double brin, créant un patchwork d'ADN préexistant et d'ADN nouvellement synthétisé. **(B) :** les chromosomes circulaires sont reconstitués grâce à la recombinaison homologue entre les intermédiaires formés (Zahradka *et al.*, 2006).

La génération d'une extrémité 3' débordante d'ADN simple brin est la toute première étape dans la réparation des cassures double brin par recombinaison homologue ou ESDSA. Chez la bactérie *E. coli*, cette maturation est principalement réalisée par le complexe hétérotrimérique RecBCD (Dillingham & Kowalczykowski, 2008).

Dans ce complexe, c'est RecB qui porte l'activité exonucléase. Cette action est régulée par RecC qui reconnaît et interagit avec les sites Chi (Wang *et al.*, 2000). Le déroulement du duplex d'ADN se fait par l'action combinée des hélicases RecB et RecD qui exercent leur activité selon des vitesses et des polarités différentes : RecD agit plus rapidement et se transloque sur le brin 5'. RecB agit plus doucement et se transloque sur le brin 3' (Spies *et al.*, 2003, Dillingham *et al.*, 2003). Lorsque RecC rencontre un site Chi, la sous unité RecD est inactivée alors que RecB continue d'agir et la dégradation du brin 3' est freinée alors que celle du brin 5' continue, ce qui génère une extrémité 3' débordante nécessaire par la suite au chargement de RecA (Anderson & Kowalczykowski, 1997). Le génome de *D. radiodurans* ne code pas les protéines RecB et RecC. Chez *E. coli*, en absence de RecBCD, la réparation des cassures de l'ADN peut être initiée par les protéines de la voie RecFOR (**Figure 9**). Cette voie permet grâce à l'hélicase RecQ et à l'exonucléase RecJ d'engendrer les extrémités 3'simple brin de l'ADN et le complexe RecFOR va alors stimuler le chargement de RecA sur ce substrat simple brin [pour revue, voir (Kowalczykowski, 2000)].

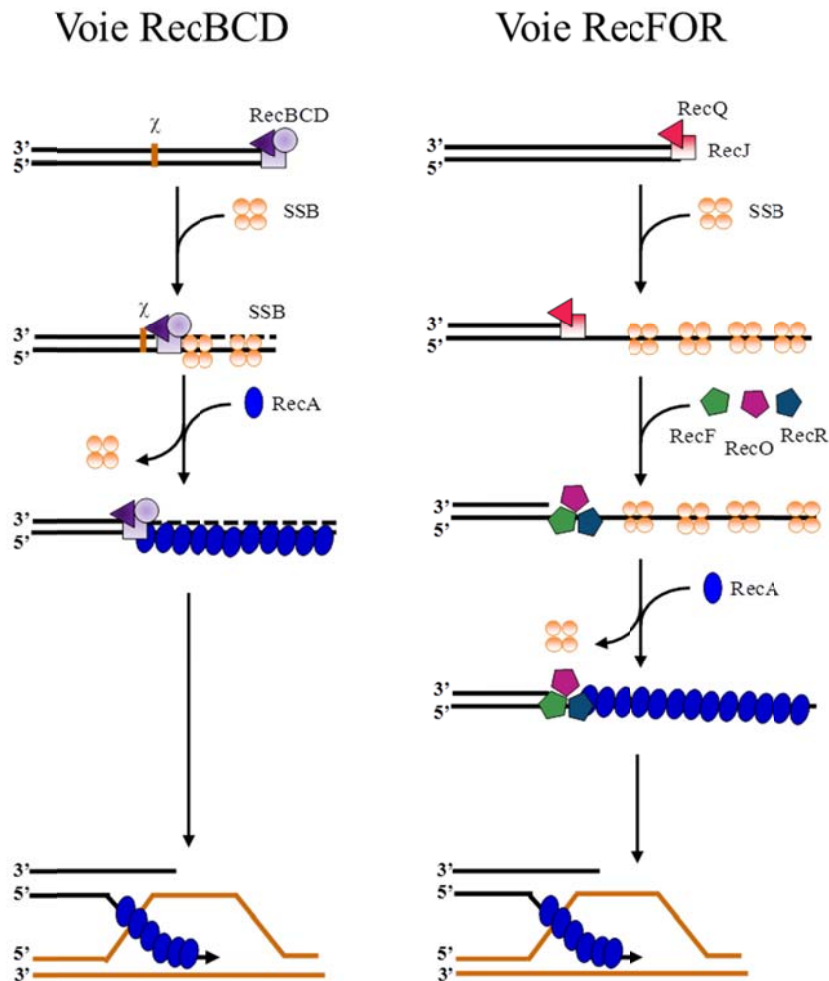


Figure 9: Voies d'initiation de la réparation par recombinaison homologue chez *E. coli* [d'après (Bentchikou *et al.*, 2010, Morimatsu & Kowalczykowski, 2003)]

D. radiodurans possède les gènes codant pour les protéines RecF, RecO, RecR, RecJ et RecQ. Il a été montré au laboratoire que les cellules de *D. radiodurans* dépourvues de la protéine RecQ, qui est l'hélicase majeure chez *E. coli* impliquée dans la réparation de l'ADN via la voie RecFOR, présentent une radiorésistance similaire à la souche sauvage chez *D. radiodurans* (Bentchikou *et al.*, 2010). Par ailleurs, les cellules dépourvues de l'hélicase UvrD chez *D. radiodurans* présentent une diminution de la radiorésistance et une augmentation du temps de réparation des cassures de l'ADN qui est corrélée avec une faible synthèse d'ADN (Bentchikou *et al.*, 2010). La combinaison des 3 délétions pour les 3 hélicases UvrD, RecQ et RecD n'accentue pas de façon significative le phénotype du simple mutant $\Delta uvrD$ (Bentchikou *et al.*, 2010). L'hélicase UvrD semble donc être impliquée dans la maturation de l'extrémité 3' et/ou dans l'étape de synthèse d'ADN dans le mécanisme de réparation par ESDSA (Bentchikou *et al.*, 2010). Cette extrémité 3' est générée par

l'exonucléase 5'-3' RecJ. Cette dernière est essentielle à la survie des cellules car elle est la seule exonucléase de cette polarité que possède *D. radiodurans*, alors que *E. coli* possède plusieurs exonucléases de polarité 5'-3' (Bentchikou *et al.*, 2010). La protéine DdrA (voir paragraphe : « protéines spécifiques des *Deinococacceae* ») protège ces extrémités 3' de la dégradation alors que les protéines SSB et/ou les protéines DdrB viennent couvrir la queue 3' d'ADN simple brin générée (Morimatsu & Kowalczykowski, 2003, Harris *et al.*, 2004, Norais *et al.*, 2009). RecF qui a la capacité de se lier au niveau de jonctions d'ADN simple brin-ADN double brin permet le recrutement et l'assemblage du complexe RecOR (avec une stœchiométrie RecO:RecR de 2:4). Le chargement de ce complexe déplace les protéines SSB (ou DdrB) de la queue 3', laissant la place à la protéine RecA (Timmins *et al.*, 2007, Bentchikou *et al.*, 2010).

(2-2) Le SSA : Ce mécanisme permet la réparation des cassures double brin de l'ADN par appariement de régions simple brin complémentaires situées sur deux fragments différents. Des extrémités 3' simple brin débordantes sont engendrées par maturation des extrémités des fragments double brin. Deux séquences simple brin complémentaires peuvent alors s'apparier pour former une région double brin. Les discontinuités simple brin peuvent ensuite être comblées par une polymérase et une ligase, rétablissant ainsi la continuité de la molécule d'ADN. L'existence du SSA chez *D. radiodurans* a été suggérée par Daly en 1996 (Daly & Minton, 1996). En effet, il observait qu'une partie des cassures double brin de l'ADN pouvaient être réparées rapidement après irradiation dans un contexte $\Delta recA$.

Plusieurs protéines pourraient être impliquées dans un mécanisme de type SSA : DdrA (homologue de Rad52), RecO, DdrB. RecO de *D. radiodurans* pourrait stimuler un alignement entre deux ADN simple brin complémentaires couverts par SSB, comme démontré pour RecO d'*E. coli* (Kantake *et al.*, 2002). Cependant RecO de *D. radiodurans* ne présente qu'une faible activité d'appariement simple brin de l'ADN comparée à celle de son homologue chez *E. coli* (Makharashvili *et al.*, 2004). De plus, les cinétiques de reconstitution du génome après irradiation d'un mutant $\Delta recO$ et $\Delta recA$ sont identiques (Bentchikou *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent que la protéine RecO n'est pas impliquée dans un mécanisme de type SSA chez *D. radiodurans*. Par contre, DdrB est un acteur majeur d'un mécanisme de réparation de l'ADN de type SSA (voir paragraphe : « protéines spécifiques des *Deinococacceae* »).

(2-3) Le NHEJ (Non Homologous End-Joining) : est un mécanisme de réparation de l'ADN qui, contrairement à la recombinaison homologue, l'ESDSA et le SSA, ne fait pas intervenir de séquence homologue pour effectuer une réparation entre deux morceaux d'ADN. Ce mécanisme permet de réparer directement un ADN cassé en juxtaposant et reliant les deux extrémités. C'est un mécanisme fréquemment utilisé par les cellules eucaryotes, notamment en phase G1 (Paques & Haber, 1999). La première étape de ce processus est la fixation de l'hétérodimère Ku70/80 sur les extrémités double brin cassées de l'ADN. Cette fixation permet une stabilisation des extrémités double brin et leur protection de la dégradation par des nucléases. Ce complexe Ku70/80 permet le recrutement de la sous unité catalytique DNA-PKcs et l'activation de son activité protéine kinase. L'holoenzyme DNA-PK est alors formée. Le recollement des extrémités peut alors se faire avec le recrutement du complexe XRCC4/DNA ligase au site lésé. Ce processus de recollement des extrémités nécessite leur maturation, plusieurs cofacteurs et complexes ont été identifiés y participant : Mre11/Rad50/Nbs1, ADN polymérase λ , μ et des ADN polymérases de la famille X (van Gent & van der Burg, 2007). Ce processus de recollement des extrémités peut laisser des cicatrices au niveau des jonctions. Identifié uniquement chez les eucaryotes jusqu'en 2004, ce mécanisme a été depuis mis en évidence chez certains procaryotes, notamment chez *Mycobacterium tuberculosis* (Della *et al.*, 2004, Gong *et al.*, 2005), *B. subtilis* (Weller *et al.*, 2002) et *Pseudomonas aeruginosa* (Zhu *et al.*, 2005). Bien qu'il n'ait encore jamais été mis clairement en évidence chez *D. radiodurans*, des expériences et des auteurs suggèrent son existence chez cette bactérie (Narumi *et al.*, 2004, Kota *et al.*, 2010).

D -Régulation

L'expression des gènes codant des protéines impliquées dans la pérennité du génome nécessite une régulation fine et contrôlée reliée au contexte métabolique et environnemental de la cellule. Chez *E. coli*, l'expression de *recA* et de plusieurs autres gènes de réparation de l'ADN sont sous le contrôle du répresseur LexA. Lorsque l'ADN est endommagé, RecA forme un nucléofilament sur l'ADN simple brin. Ce nucléofilament active l'autoclivage de LexA, la concentration cellulaire de LexA dans la cellule diminue et entraîne la dérepression d'environ 40 gènes SOS. *D. radiodurans* possède deux homologues de LexA, LexA1 et LexA2. Bien que ces deux protéines soient clivées en présence de RecA, d'ADN simpl brin et d'ATP, l'induction de *recA* après irradiation γ n'est contrôlée ni par LexA1, ni par LexA2

(Narumi *et al.*, 2001, Bonacossa de Almeida *et al.*, 2002, Satoh *et al.*, 2006). L'analyse transcriptomique et l'analyse du génome de *D. radiodurans* et *D. geothermalis* ont permis de définir un groupe d'une vingtaine de gènes qui ont la particularité d'être induits après irradiation et de présenter un motif régulateur appelé RDRM (pour Radiation Dessiccation Response Motif) dans leur séquence promotrice (Tanaka *et al.*, 2004, Makarova *et al.*, 2007). Ces gènes font partie du régulon RDR pour Radiation Dessiccation Response. Le motif RDRM est une séquence palindromique de 17 paires de bases, son taux de conservation est variable (**Figure 10**).

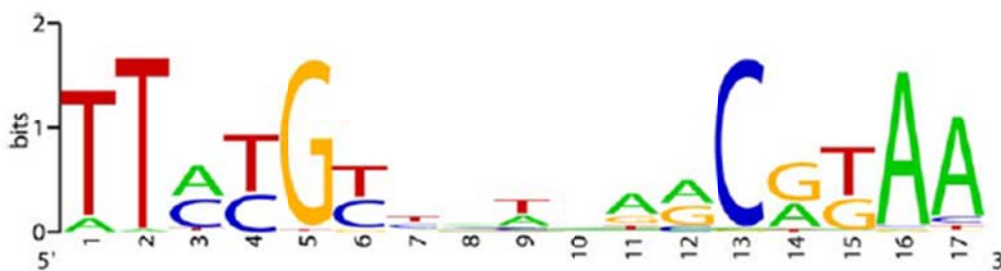


Figure 10 : Motif RDRM chez *D. radiodurans* (Makarova *et al.*, 2007).

Parmi les gènes appartenant à ce régulon RDR, on retrouve des gènes impliqués dans le maintien de l'intégrité des génomes comme *recA* ou *gyrA*, ainsi que des gènes codants des protéines spécifiques des *Deinococcaceae* qui seront décrites ultérieurement, comme les gènes *ddrA*, *ddrB*, *pprA*, ...

Des travaux ont montré que la protéine IrrE (également appelée PprI) était nécessaire à l'expression des gènes *recA*, *pprA* et *ssb*, appartenant à ce régulon (Earl *et al.*, 2002a, Hua *et al.*, 2003, Lu *et al.*, 2012). IrrE est une métallo-protéase, son activité protéolytique manganèse dépendante est essentielle à la radiorésistance (Vujicic-Zagar *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2015). La structure d'IrrE de *D. deserti* a permis de mettre en évidence l'existence de 3 domaines, un domaine zinc/manganèse peptidase, un domaine central hélice tour hélice et un domaine C-terminal « senseur-like » de type GAF (Vujicic-Zagar *et al.*, 2009). Les cellules dépourvues d'IrrE sont très sensibles aux agents qui endommagent l'ADN (Earl *et al.*, 2002a, Hua *et al.*, 2003). De récents travaux menés au laboratoire et par l'équipe dirigée par Arjan de Groot ont permis de proposer un modèle de régulation des gènes appartenant au régulon RDR. Ce modèle fait intervenir IrrE et une autre protéine spécifique des *Deinococcaceae* : le répresseur

DdrO, qui appartient aussi au régulon RDR (Ludanyi *et al.*, 2014, Devigne *et al.*, 2015b) (**Figure 11**). Ces travaux ont donné lieu à un article qui est fourni en document annexe.

Hors contexte de stress, DdrO sous forme active est produite à son niveau basal et réprime l'expression des gènes du régulon RDR. Lorsque des dommages à l'ADN sont produits, IrrE est activée et clive alors DdrO qui n'a plus la capacité de se fixer sur les régions promotrices et les gènes concernés sont alors dérprimés (Ludanyi *et al.*, 2014, Devigne *et al.*, 2015b). Une déplétion de la protéine DdrO mène à une augmentation de l'expression des protéines PprA, GyrA et DdrB (gènes du régulon RDR) (Devigne *et al.*, 2015b). Le gène *ddrO* fait partie du régulon RDR et contrôle donc son expression. Lorsque le clivage de DdrO par IrrE s'arrête, DdrO retrouve son niveau d'expression basal et réprime de nouveau l'expression des gènes du régulon RDR. En revanche, lorsque l'activation du régulateur IrrE perdure et/ou si le niveau d'expression basal de la protéine DdrO n'est pas retrouvé rapidement, les cellules semblent s'engager dans une voie apoptotique (Devigne *et al.*, 2015b) (**Figure 11**). En effet, une déplétion en DdrO entraîne l'apparition de marqueurs caractéristiques de l'apoptose chez les bactéries (cellules fantômes, formation de « bulles » membranaires, fragmentation de l'ADN) (Devigne *et al.*, 2015b). Il a été montré que le gène *ddrO* est essentiel à la viabilité cellulaire chez *D. radiodurans* et *D. deserti* (Devigne *et al.*, 2015b, Ludanyi *et al.*, 2014). Très récemment l'équipe de Hua a montré par des expériences de gel retard la fixation de la protéine purifiée DdrO de *D. radiodurans* sur de l'ADN correspondant à diverses régions promotrices (*recA*, *ddrB*, *pprA*, *ddrA*, *ssb*, *recQ*, ...) contenant le motif RDRM (Wang *et al.*, 2015). Cependant, les conditions expérimentales utilisées pour les gels retard ne permettent pas de conclure à une fixation spécifique puisqu'aucun ADN compétiteur n'est présent. Au laboratoire, nous avons également purifié DdrO de *D. radiodurans* et obtenu dans les mêmes conditions en présence d'ADN contenant le motif RDRM un retard sur gel. Cependant, lorsqu'on ajoute de l'ADN non spécifique, DdrO ne se fixe plus à l'ADN. Ces résultats suggèrent que DdrO aurait besoin d'un cofacteur pour pouvoir se fixer de manière spécifique sur les régions contenant le motif RDRM.

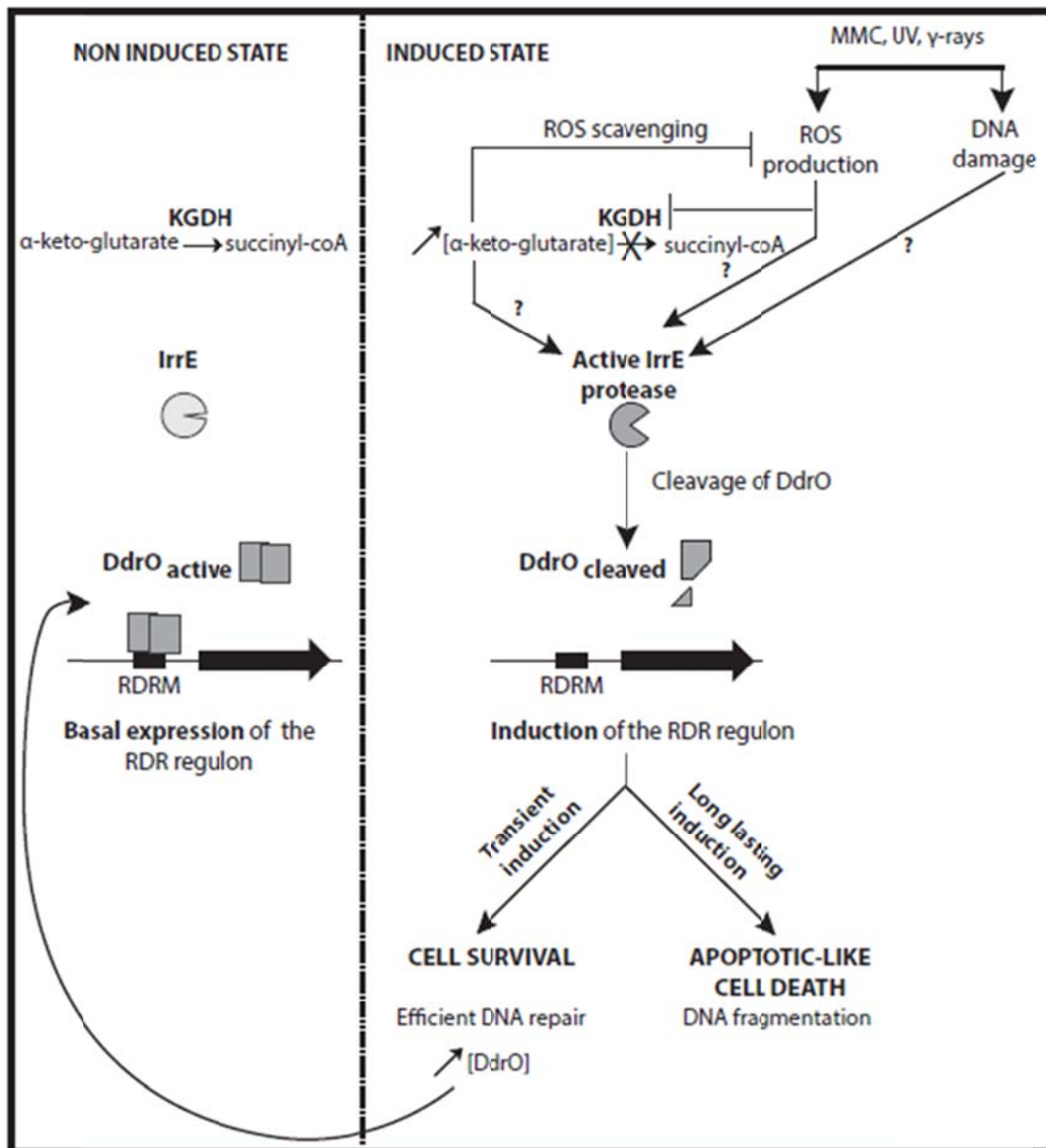


Figure 11 : Modèle de régulation du régulon RDR par DdrO et IrrE (Devigne *et al.*, 2015b).

La nature des senseurs et des signaux dans la réponse aux agents qui endommagent l'ADN ainsi que le mécanisme de perception du signal restent encore inconnus. Cependant, au cours de notre étude afin d'identifier des gènes impliqués dans la régulation de la réponse aux radiations ionisantes, nous avons construit une banque de mutants d'insertion dans une souche contenant une fusion rapportrice de l'activité du promoteur de *ddrB* (*P_{ddrB}::lacZ*). Cette banque de mutants a été criblée pour des mutants qui exprimaient constitutivement la protéine de fusion ou qui étaient incapables d'induire son expression après traitement à la mitomycine C. De nombreux mutants d'insertions (16 mutants/26) ont été localisés dans les gènes codant les deux sous-unités de l'alpha-céto-glutarate déshydrogénase (KGDH) (Devigne *et al.*,

2015b). Cette enzyme du cycle de Krebs catalyse la conversion de l'alpha-cétoglutarate en succinyl-CoA et son activité est sensible au ROS (Tretter & Adam-Vizi, 2005). La sous-unité E2 de KGDH a été proposée comme senseur du taux d'oxydation de la cellule (Mailloux *et al.*, 2007, Mailloux *et al.*, 2009). La présence de ROS dans la cellule diminuerait l'activité de l'enzyme KGDH entraînant une accumulation de l'alpha-cétoglutarate, une molécule à l'activité anti-oxydante. Il a été proposé que le taux d'oxydation de la cellule influencerait l'activité de la protéase IrrE (Devigne *et al.*, 2015b).

E -Protéines spécifiques des *Deinococcaceae*

L'analyse globale de l'expression des gènes après irradiation ou dessiccation a été très fructueuse pour identifier de nouveaux gènes impliqués dans la radiorésistance de la bactérie *D. radiodurans*. Parmi les 72 gènes induits après irradiation et les 73 induits après dessiccation, 43 sont communs (Tanaka *et al.*, 2004). On trouve parmi les gènes induits le gène *recA* ainsi que des gènes impliqués dans la réparation des lésions de l'ADN par excision de nucléotides, dans l'adaptation au stress oxydatif ou la restauration du surenroulement de l'ADN. Mais cette analyse a surtout mis en évidence la forte induction de plusieurs gènes spécifiques aux *Deinococcaceae* après exposition au rayonnement ionisant ou à une dessiccation prolongée (Tanaka *et al.*, 2004). L'inactivation de plusieurs de ces gènes, parmi lesquels on peut citer *ddrA*, *ddrB*, et *pprA*, a permis de montrer que les protéines codées par ces gènes jouent un rôle crucial dans la radiorésistance de *D. radiodurans* (Figure 12) (Tanaka *et al.*, 2004).

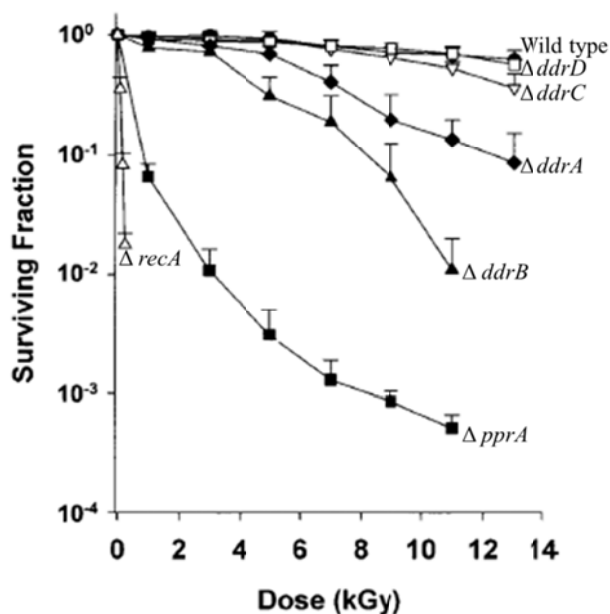


Figure 12: Courbe de survie aux rayonnements γ de différents mutants de *D. radiodurans* (Tanaka *et al.*, 2004).

- La protéine DdrA, homologue de Rad52, est impliquée dans la protection de l'ADN contre la dégradation des extrémités 3' simple brin (Harris *et al.*, 2004). Des travaux de 2006 réalisés au laboratoire ont montré que dans un contexte cellulaire où la concentration de la protéine RecA est limitante, la présence de DdrA est cruciale pour la survie des cellules. Ces résultats suggèrent un rôle de DdrA dans le maintien des substrats de recombinaison, en particulier en présence d'un grand nombre de cassures de l'ADN qui pourrait rendre la concentration de RecA limitante (Jolivet *et al.*, 2006).

-Le mutant de délétion $\Delta ddrB$ présente une forte diminution de radorésistance en comparaison à une souche sauvage. La protéine DdrB se fixe avec une grande affinité sur de l'ADN simple brin, et présente des propriétés similaires à celles de la protéine SSB d'*E. coli* (Norais *et al.*, 2009). Il a été montré que DdrB joue un rôle majeur dans les étapes précoces de réparation de l'ADN lorsque les cellules sont exposées à de fortes doses d'irradiation γ . Des expériences *in vitro* (Xu *et al.*, 2010) et *in vivo* (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011) suggèrent que DdrB permette l'assemblage d'une myriade de petits fragments par un mécanisme de type SSA générant ainsi des substrats utilisables pour la reconstitution du génome par le mécanisme ESDSA (**Figure 13**). DdrB joue également un rôle majeur dans la transformation par de l'ADN plasmidique (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011).

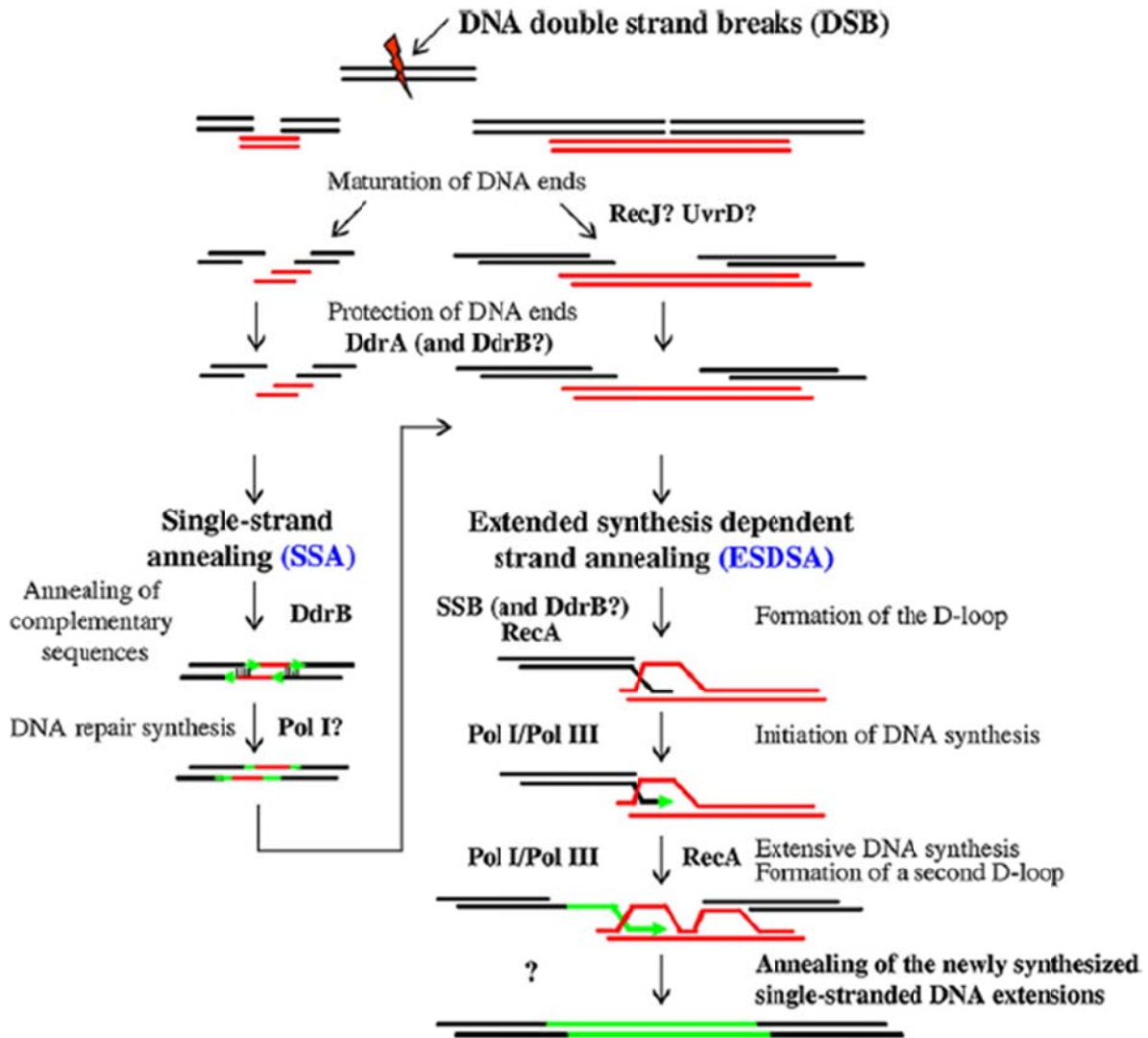


Figure 13: Modèle de réparation des cassures double brin de l'ADN par SSA et ESDSA chez la bactérie *D. radiodurans* (Bouthier de la Tour *et al.*, 2011).

-L'inactivation de *ddrC* et *ddrD* ne diminuent pas la résistance des cellules aux rayonnements γ [(Tanaka *et al.*, 2004) (Figure 12). En revanche le double mutant $\Delta ddrC \Delta ddrD$ est légèrement plus sensible qu'une souche sauvage, ce qui suggère une redondance dans les fonctions des protéines codées par ces 2 gènes.

-PprA (pleiotropic protein promoting DNA repair): l'étude transcriptomique de *D. radiodurans* après irradiation en 2004 a permis d'identifier le transcrite qui code pour la protéine PprA faisant partie des plus induits après rayonnements γ (Tanaka *et al.*, 2004). Cette protéine est spécifique des *Deinococcaceae* et aucun homologue chez d'autres organismes,

autre que les *Deinococcaceae*, n'a été identifié. En absence de la protéine PprA, les cellules deviennent très sensibles aux rayonnements γ , mais également aux UV et à la mitomycine C, suggérant une importante implication de la protéine lorsque des dommages à l'ADN sont produits dans les cellules. Sa délétion confère aux cellules une radiosensibilité importante en comparaison à ce qui a pu être observé dans des mutants dépourvus d'autres gènes induits par les rayonnements γ comme *ddrA* ou *ddrB* (**Figure 12**).

Il a été proposé à plusieurs reprises que PprA puisse jouer un rôle dans la réparation des cassures de l'ADN. En effet, *in vitro*, la protéine recombinante PprA se lie à de l'ADN double brin qui présente des cassures simple ou double brin (Narumi *et al.*, 2004). Il semblerait que PprA se fixe sur de l'ADN double brin avec une meilleure affinité pour les extrémités. Cette protéine a également la capacité de protéger les extrémités d'ADN double brin de la dégradation par des exonucléases cellulaires et de stimuler l'activité ligase de la T4 ligase (Narumi *et al.*, 2004). D'autre part, la protéine PprA a été identifiée dans un complexe protéique qui contient des protéines impliquées dans la maturation des extrémités d'ADN et dans la synthèse d'ADN en association avec l'ADN ligase LigB et une protéine kinase (Kota & Misra, 2008, Kota *et al.*, 2010). *In vitro*, il a été montré que l'activité ligase de LigB (DRB0100) requerrait la présence de PprA (Kota *et al.*, 2010). Cette ligase LigB de *D. radiodurans* est similaire aux ligases eucaryotes impliquées dans le mécanisme de réparation des cassures double brin de l'ADN de type NHEJ. La présence d'une ADN polymérase de la famille X très rare chez les bactéries (Lecoïnte *et al.*, 2004b) renforce l'idée de l'existence d'un mécanisme de réparation de l'ADN de type NHEJ dans lequel PprA jouerait un rôle important, bien qu'un tel mécanisme n'ait jamais été démontré chez *D. radiodurans*.

Il a également été proposé que PprA puisse aider les cellules à surmonter les effets des stress oxydatifs (Kota & Misra, 2006). En effet, l'expression de PprA chez la bactérie *E. coli* rend les cellules plus résistantes au peroxyde d'hydrogène, mais n'a pas d'effet sur la résistance aux rayonnements γ ou aux UV. Ces mêmes travaux ont également montré que des cellules d'*E. coli* exprimant la protéine PprA de *D. radiodurans* présentaient une stimulation de l'activité catalase de KatE *in vitro* et *in vivo*. Cependant, l'activité catalase n'est stimulée par PprA que d'un facteur 1,7, et les cellules d'*E. coli* exprimant PprA sont plus résistantes au peroxyde d'hydrogène d'un facteur 2.5 à 3.5 en comparaison d'une souche sauvage (Kota & Misra, 2006).

Les différentes hypothèses proposées par les différents laboratoires travaillant sur PprA pour expliquer le rôle de cette protéine dans les mécanismes de radiorésistance ne semblant pas aller dans la même direction, nous avons décidé de réaliser un travail plus approfondi sur la caractérisation du mutant $\Delta pprA$ exposé aux rayonnements γ . Ces travaux ont confirmé l'extrême radiosensibilité de la souche dépourvue de PprA mise en évidence par Tanaka (Tanaka *et al.*, 2004). En effet, moins de 10% des cellules dépourvues de PprA survivent à une dose d'irradiation de 3.8 kGy contre 100% pour la souche sauvage. Bien que très radiosensible, le mutant $\Delta pprA$ ne présente un retard de réparation de l'ADN que de 30 minutes à 1 heure en comparaison à une souche sauvage (Devigne *et al.*, 2013). Au cours de ma première année de thèse, j'ai mis en évidence l'apparition de graves problèmes de ségrégation des chromosomes et des anomalies dans la division cellulaire des mutants $\Delta pprA$ après irradiation. Nos résultats, présentés dans la partie II de ce manuscrit, suggèrent un rôle important de la protéine PprA dans la ségrégation des chromosomes après réparation de l'ADN et reprise, de la division cellulaire après irradiation (Devigne *et al.*, 2013). Dans la seconde partie de cette introduction, les aspects concernant le cycle cellulaire et la ségrégation des chromosomes seront donc abordés.

III Cycle cellulaire chez les bactéries

Au cours du cycle cellulaire, l'ensemble du génome d'une cellule est transmis à chacune des deux cellules filles. Le cycle cellulaire comprend une série d'événements qui se succèdent entre deux divisions cellulaires. La duplication (ou répllication) du génome et la ségrégation (ou séparation) égale des deux copies du génome dans chaque cellule fille sont les deux étapes essentielles pour assurer le maintien du patrimoine génétique.

A -Réplication des chromosomes

(1) Réplication de l'ADN chez les eucaryotes et les bactéries

Chez les cellules eucaryotes, les étapes de répllication, condensation, ségrégation des chromosomes, division cellulaire puis décondensation sont bien séparées au cours de leur cycle cellulaire. L'enchaînement de ces événements se produit toujours dans cet ordre et une fois par cycle cellulaire. Il n'en est pas de même pour les cellules bactériennes. Leur temps de

multiplication est plus court que celui des cellules eucaryotes et toutes ces étapes se déroulent en même temps au cours du cycle cellulaire.

Les chromosomes eucaryotes peuvent initier leur réplication en différents endroits, plusieurs origines de réplication (*oriC*) étant dispersées sur les chromosomes. En revanche pour les cellules bactériennes, il n'existe qu'une seule origine de réplication par chromosome. Cependant, la bactérie modèle *E. coli* est capable de se diviser toutes les 20 minutes alors qu'il lui faut environ 40 minutes pour répliquer complètement son génome (Bremer & Dennis, 1987). Pour rattraper cela, *E. coli* est capable d'initier une nouvelle réplication à partir de la même origine de réplication alors que le premier cycle de réplication n'est pas encore terminé. Le nombre de copie de *oriC* par cellule a été mesuré, il a été montré que *E. coli* peut contenir 8 à 16 copies de *oriC* ce qui signifie que la réplication peut être initiée 3 à 4 fois entre deux divisions (Morigen *et al.*, 2009). Les cellules de cette bactérie modèle pallient ainsi au fait que le temps nécessaire à la réplication complète d'un chromosome est plus long que son temps de génération en milieu riche.

(2) Le chromosome bactérien et sa réplication

La réplication du chromosome chez les bactéries est initiée à un endroit unique appelé *oriC* pour origine de réplication chromosomique et se termine dans une région qui lui est opposée, la région terminus Ter, qui est centrée autour du site *dif*. La réplication se fait de façon bidirectionnelle et se propage de part et d'autre d'*oriC*, 2 fourches de réplication sont ainsi formées et évoluent dans des directions opposées. Le chromosome est ainsi divisé en 2 bras de réplication de même taille appelés également réplichores. Ces bras sont définis par l'axe *ori/dif* et sont appelés bras gauche et bras droit. Un schéma de l'organisation du chromosome d'*E. coli* est présenté **Figure 14**. Les gènes dont l'expression est très forte dans la cellule sont plutôt localisés proche de l'origine de réplication, ce qui crée un gradient du dosage des gènes depuis l'*oriC* vers la région Ter [pour revue (Rocha, 2004)].

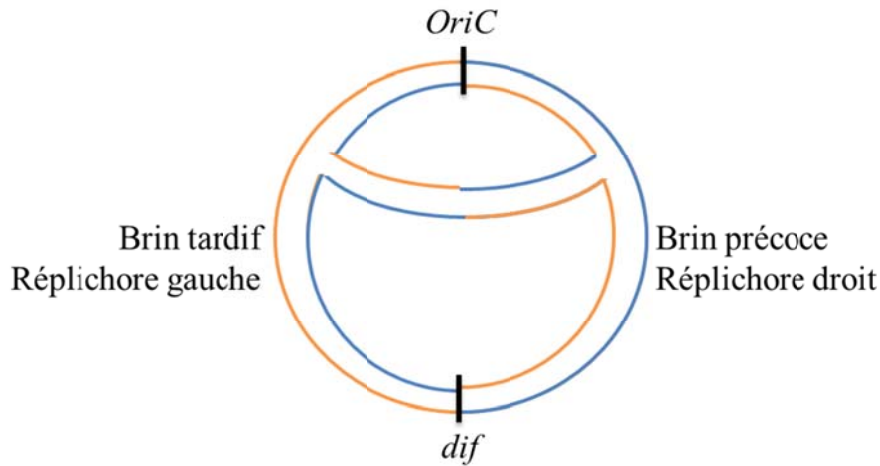


Figure 14: Réplication du chromosome d' *E.coli*

La réplication des chromosomes bactériens est asymétrique, l'un des 2 brins est répliqué de façon continue, il est appelé brin leading ou brin précoce, et l'autre brin est répliqué de façon discontinue et est appelé brin lagging ou brin tardif. Il a été observé des biais de composition en nucléotides et des biais d'orientation de gènes entre les réplichores droit et gauche.

B -Coordination du cycle cellulaire et du cycle de réplication

Bien que le cycle cellulaire et la réplication des cellules bactériennes soient découplés, il est absolument nécessaire que ces 2 cycles soient coordonnés. A l'issue du cycle cellulaire, les 2 cellules filles générées doivent impérativement posséder exactement le même ADN, en terme de quantité et d'information génétique. Pour cela, la fermeture du septum de division cellulaire, doit parfaitement être synchronisée avec la ségrégation des chromosomes obtenus lors de la réplication. Cette division doit se faire sans guillotiner le chromosome, de façon à avoir une répartition de l'information génétique équitable entre les 2 cellules filles. Chez les bactéries, c'est la protéine FtsZ qui joue un rôle majeur dans la division cellulaire. Cette protéine polymérise sous forme de filaments de façon GTP-dépendante. Ces filaments forment l'anneau de septation (anneau Z). L'assemblage de cet anneau est coordonné grâce à l'implication de nombreuses autres protéines afin que cet anneau soit en place au bon endroit et au bon moment au cours du cycle cellulaire (Adams & Errington, 2009). La mise en place de cet anneau de septation est contrôlée et régulé par 2 systèmes : les systèmes Min et NO (pour « Nucleoid Occlusion »).

Le système Min empêche la polymérisation de FtsZ au niveau des pôles cellulaire en créant un gradient d'inhibition de FtsZ aux pôles via le complexe MinCDE (Lutkenhaus, 2007). Lorsque les protéines Min sont absentes chez *E. coli*, des formations anormales de l'anneau Z sont observées et celui-ci se met en place au niveau des pôles, la division cellulaire se produisant à ce niveau et on observe la production de mini-cellules (Di Ventura *et al.*, 2013). Chez *E. coli*, MinD est associée à la membrane et recrute MinC qui est un inhibiteur de la polymérisation de FtsZ. Des molécules de MinE qui forme une structure de type anneau libèrent MinD (et donc MinC) de la membrane en stimulant l'activité ATPase de MinD. Dans le cytoplasme, MinD-ADP est « recyclé » en MinD-ATP qui s'assemble alors au pôle opposé. Les protéines MinCDE établissent ainsi un gradient de concentration de MinCD en oscillant de pôle à pôle. La concentration de MinC est ainsi plus importante au pôle et plus faible au centre de la cellule empêchant ainsi la formation aux pôles de l'anneau Z (Raskin & de Boer, 1999) (**Figure 15**). Un autre système intervient dans la régulation de la mise en place de l'anneau, c'est le système NO, qui empêche une division précoce. Cependant le mécanisme moléculaire de ce système n'est pas encore totalement compris. Chez *B. subtilis*, la protéine Noc intervient dans ce processus, chez *E. coli* c'est la protéine SlmA qui est impliquée dans ce mécanisme d'occlusion du nucléoïde (Woldringh *et al.*, 1991, Bernhardt & de Boer, 2005, Wu & Errington, 2012, Wu *et al.*, 2009). Ces protéines se lient spécifiquement à des séquences d'ADN qui sont éparpillées sur le chromosome mais absentes de la région terminus. On dit que ce sont des protéines effectrices du nucléoïde. Chez *B. subtilis* et *E. coli*, avant le début de la réplication, la région *oriC* est au milieu de la cellule, associée à SlmA ou à Noc. Ces protéines inhibent la polymérisation de FtsZ localement. Lorsque la réplication commence, les *oriC* associées aux protéines effectrices sont ségréguées et sont déplacées aux pôles de la cellule chez *B. subtilis* et au $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ de la cellule chez *E. coli*. Lorsque toute la partie du chromosome protégée par les protéines effectrices a été ségréguée, la zone au milieu de la cellule s'en trouve dépourvue, permettant la polymérisation de FtsZ et la formation du septum de division (**Figure 15**).

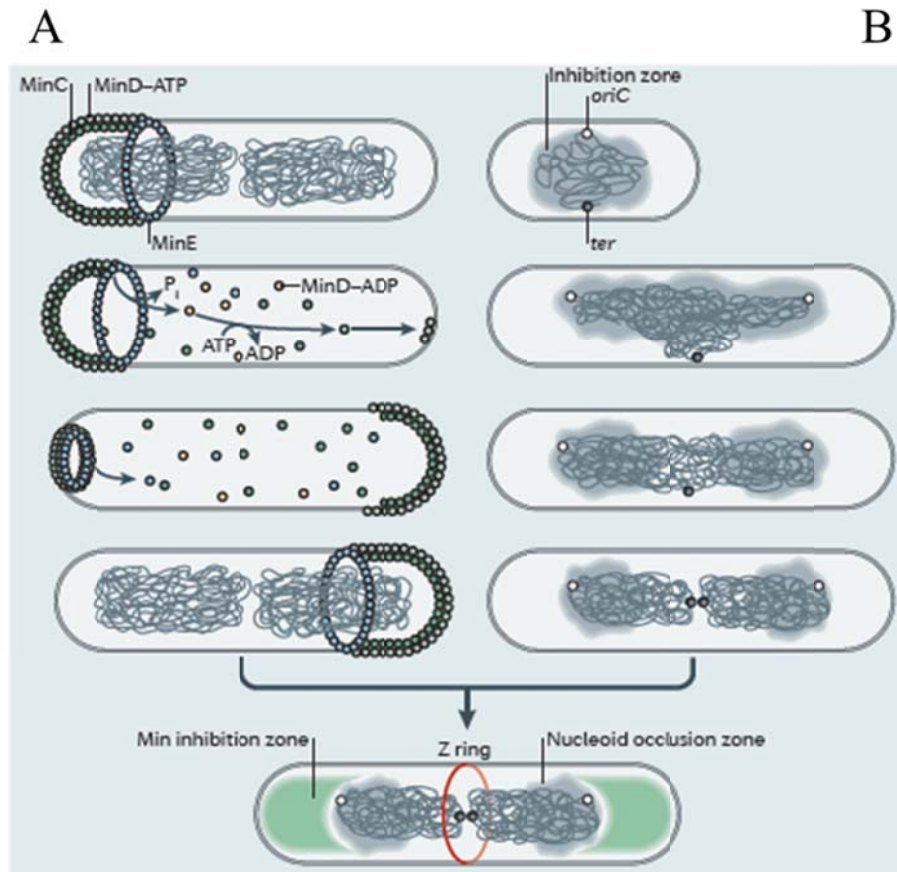


Figure 15 : Les systèmes Min et NO : 2 systèmes de contrôle de la mise en place de l’anneau de division FtsZ chez *E. coli* (Pinho *et al.*, 2013) (A) Système Min (B) système NO. (Pour les détails, voir texte principal).

IV Structure du chromosome bactérien

La structure elle-même du chromosome bactérien a un rôle primordial dans les mécanismes biologiques. Celui-ci est très structuré contrairement à ce qui a été longtemps pensé. Par manque de techniques appropriées d’observation des éléments microscopiques, on pensait que les chromosomes bactériens étaient répartis de manière aléatoire dans la cellule et adoptaient une conformation diffuse. Pour pouvoir être contenu dans des cellules comme *E. coli* qui font 2 μm de long, cet ADN doit obligatoirement être très structuré et compacté en une structure appelé nucléoïde. Cette structuration est d’autant plus importante qu’elle doit être adaptée et permettre la réalisation des processus biologiques tels que la réplication du génome et l’expression des gènes. Chez les bactéries, la compaction de l’ADN est régulée par

un réseau d'interaction entre les protéines abondantes du nucléoïde (NAPs), les protéines de la famille SMC et les ADN topoisomérases.

A -Les protéines NAP « Nucleoid Associated Proteins »

La structuration du nucléoïde est entre autre liée à la présence de protéines associées à l'ADN, appelées « Nucleoid Associated Proteins » ou NAPs (McLeod & Johnson, 2001). Certaines de ces protéines jouent un rôle équivalent dans l'organisation du chromosome sont de ce fait aussi appelées « Histone-like ». En structurant les chromosomes, elles permettent aussi d'exercer une régulation sur la transcription, la recombinaison et la réplication (Travers & Muskhelishvili, 2005). Elles ont un petit poids moléculaire et sont abondantes dans les cellules (Varshavsky *et al.*, 1977). Bien qu'elles soient appelées « Histone-like », elles ne s'associent cependant pas de la même manière à l'ADN que les histones eucaryotes. Chez les eucaryotes, l'ADN s'enroule autour des histones alors que les NAPs s'associent de façon spécifique ou non à l'ADN en formant des coudes et des plis.

Il existe une douzaine de protéines NAPs chez *E. coli* dont le taux d'expression dans les cellules est dépendant de la phase de croissance dans laquelle se trouvent les bactéries (Azam & Ishihama, 1999). Les protéines NAPs les plus abondantes en phase exponentielle de croissance sont les protéines Fis, Hfq et HU tandis qu'en phase stationnaire la protéine Dps devient majoritaire (Azam & Ishihama, 1999). En phase stationnaire, l'expression de la protéine Fis devient très faible. L'adaptation de l'expression de ces protéines selon les conditions de croissance permet d'adapter le degré de compaction du nucléoïde (Frenkiel-Krispin *et al.*, 2001, Azam & Ishihama, 1999, Almiron *et al.*, 1992).

(1) Fis pour « Factor for Inversion Stimulation »

Chez *E. coli*, l'expression de la protéine Fis est très forte en phase exponentielle de croissance, et est fortement diminuée au moment du passage en phase stationnaire (Azam & Ishihama, 1999). En plus de structurer l'ADN, il semblerait que cette protéine ait également des activités régulatrices sur l'expression de certains gènes en modulant le degré de surenroulement de l'ADN dans les régions promotrices de ces gènes (Bosch *et al.*, 1990, Schneider *et al.*, 1999, Kelly *et al.*, 2004).

(2) IHF pour « Integration Host Factor »

Cette protéine présente de grandes homologies avec la protéine HU. Elle se fixe de façon spécifique sur l'ADN et le structure en créant des coudes de 160° (Rice *et al.*, 1996). Comme pour Fis, IHF semble avoir un rôle dans la régulation de l'expression de certains gènes en facilitant l'interaction entre l'ARN polymérase et leur région régulatrice (Bi & Zhang, 2014, Seong *et al.*, 2002).

(3) H-NS pour « Heat-stable Nucleoid-Structuring protein »

Ces protéines ont des activités de condensine (Dame *et al.*, 2000) et permettent la formation de structures en forme de boucle en se fixant à différents endroits distants du chromosome puis en interagissant entre elles (Dame *et al.*, 2000). Elles ont aussi des activités de régulation de la transcription en se fixant sur des séquences d'ADN spécifiques conservées (Bouffartigues *et al.*, 2007).

(4) HU pour «Heat-Unstable protein »

Elle est très conservée chez les bactéries et a une forte similarité avec l'histone H2B des eucaryotes (Wery *et al.*, 2001). Chez *E. coli*, 2 gènes codent HU, *hupA* et *hupB*, codant les protéines HU α et HU β qui s'associent *in vitro* en homodimère ou hétérodimère (Rouviere-Yaniv *et al.*, 1979). HU se fixe à l'ADN sans spécificité de séquence.

(5) Dps pour « DNA-binding Protein from Straved Cells »

Chez la bactérie *E. coli*, la protéine Dps est abondante et se fixe sur l'ADN de façon indépendante de la séquence (Almiron *et al.*, 1992). Son niveau d'expression varie dans des conditions de stress oxydatif et en fonction de la phase de croissance (Ali Azam *et al.*, 1999). Cette protéine chez *E. coli* peut exercer une double protection de l'ADN en jouant un rôle important dans le stockage du fer, ce qui favorise la neutralisation des ROS ainsi qu'en se fixant sur l'ADN pour former des structures cristallines Dps-ADN (Haikarainen & Papageorgiou, 2010).

Parmi les cinq protéines NAPs abondantes chez *E. coli* citées ci-dessus, on ne trouve que l'homologue de HU chez la bactérie *D. radiodurans* et deux homologues de Dps (Dps1 et Dps2). HU est codée par un seul gène chez *D. radiodurans* : le gène *hbs* qui est essentiel à la viabilité des cellules (Nguyen *et al.*, 2009). L'utilisation d'un système d'expression conditionnel a permis de réaliser une déplétion conditionnelle de la protéine HU, et dans les

cellules progressivement privées de HU, on observe une décondensation de l'ADN puis son fractionnement et enfin une lyse cellulaire (Nguyen *et al.*, 2009). Le **Tableau 1** fait le bilan des protéines présentes chez *D. radiodurans*, *D. deserti* et *D. geothermalis* qui sont susceptibles de jouer un rôle dans la compaction de l'ADN et l'organisation du chromosome.

Nom de gène	<i>D. radiodurans</i>	<i>D. deserti</i>	<i>D. geothermalis</i>	Annotation de la protéine
Protéines NAPs				
Dps 167 aa (<i>dps</i>) chez <i>E. coli</i> 145 aa (<i>dpsI</i>) et 153 aa (<i>mrgA</i>) chez <i>B. subtilis</i>	DR_2263 (207 aa) DR_B0092 (241 aa)	Deide_21200 (203 aa)	Dgeo_0281 (222 aa)	Protéine de fixation à l'ADN Dps
HU 90 aa (<i>hupA</i>) et 90 aa (<i>hupB</i>) chez <i>E. coli</i> 92 aa (<i>hbs</i>) chez <i>B. subtilis</i>	DR_A0065 (122 aa)	Deide_2p01940 (121 aa) Deide_00200 (115 aa) Deide_3p00060 (121 aa) Deide_3p00832 (166 aa)	Dgeo_2501 (149 aa) Dgeo_0175 (116 aa)	Protéine de fixation à l'ADN histone-like-HU
DnaA 467 aa (<i>dnaA</i>) chez <i>E. coli</i> 446 aa (<i>dnaA</i>) chez <i>B. subtilis</i>	DR_0002 (466 aa)	Deide_00010 (456 aa)	Dgeo_0001 (470 aa)	Protéine initiatrice de la réplication des chromosomes
Lrp 164 aa (<i>lrp</i>) chez <i>E. coli</i> 136 aa (<i>lrpA</i>), 149 aa (<i>lrpB</i>) et 144 aa (<i>lrpC</i>) chez <i>B. subtilis</i>	DR_1894 (195 aa) DR_0200 (170 aa)	Deide_18030 (156 aa) Deide_3p00770 (155 aa) Deide_03140 (157 aa) Deide_09020 (153 aa)	Dgeo_0772 (156 aa) Dgeo_0987 (153 aa)	Régulateur transcriptionnel Lrp
Topoisomérases				
GyrA 875 aa (<i>gyrA</i>) chez <i>E. coli</i> 821 aa (<i>gyrA</i>) chez <i>B. subtilis</i>	DR_1913 (812 aa)	Deide_12520 (811 aa)	Dgeo_1016 (809 aa)	Sous unité α de l'ADN gyrase
GyrB 804 aa (<i>gyrB</i>) chez <i>E. coli</i> 638 aa (<i>gyrB</i>) chez <i>B. subtilis</i>	DR_0906 (663 aa)	Deide_15490 (674 aa)	Dgeo_0546 (711 aa)	Sous unité β de l'ADN gyrase
TopoIA 865 aa (<i>topA</i>) chez <i>E. coli</i> 691 aa (<i>topA</i>) chez <i>B. subtilis</i>	DR_1374 (1021 aa)	Deide_07410 (966 aa)	Dgeo_2001 (964 aa)	ADN topoisomérase I (TopoIA)
TopoIB absente chez <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i>	DR_0690 (346 aa)	Deide_00840 (343 aa)	Dgeo_2058 (349 aa)	ADN topoisomérase de type eucaryote (TopoIB)
Protéines de la famille SMC ou associées à SMC				
SMC 1186 aa (<i>smc</i>) chez <i>B. subtilis</i>	DR_1471 (1100 aa)	Deide_08800 (1096 aa)	Dgeo_0822 (1100 aa)	Protéine de ségrégation SMC
ScpB 440 aa (<i>mukF</i>) chez <i>E. coli</i> 197 aa (<i>scpB</i>) chez <i>B. subtilis</i>	DR_1861 (182 aa)	Deide_08600 (181 aa)	Dgeo_0759 (176 aa)	Facteur de condensation et partition des chromosomes
SbcC 1048 (<i>sbcC</i>) chez <i>E. coli</i> 1130 aa (<i>sbcC</i>) chez <i>B. subtilis</i>	DR_1922 (909 aa)	Deide_16170 (911 aa)	Dgeo_0823 (910 aa)	Exonucléase SbcC Protéine SMC-like
SbcD 400 aa (<i>sbcD</i>) chez <i>E. coli</i> 391 aa (<i>sbcD</i>) chez <i>B. subtilis</i>	DR_1921 (416 aa)	Deide_16180 (393 aa)	Dgeo_0824 (395 aa)	Exonucléase sbcD
RecN 553 aa (<i>recN</i>) chez <i>E. coli</i> 576 aa (<i>recN</i>) chez <i>B. subtilis</i>	DR_1477 (564 aa)	Deide_12310 (558 aa)	Dgeo_1194 (555 aa)	Protéine de réparation de l'ADN RecN

Tableau 1 : Protéines associées au nucléoïde chez *D. radiodurans*, *D. deserti* et *D. geothermalis*

B -Les protéines de la famille SMC

(1) Caractéristiques générales des protéines de la famille SMC (Structural Maintenance of Chromosome) et SMC-like

Les protéines de la famille SMC et SMC-like sont conservées au sein des domaines du vivant et sont impliquées dans différents aspects de la dynamique des chromosomes tels que la condensation des chromosomes, la cohésion des chromatides sœurs mais également la partition des chromosomes, la réparation de l'ADN et la recombinaison [pour revue (Strunnikov, 2006)]. Les domaines N et C terminaux de ces protéines sont reliés entre eux par 2 longs domaines coiled-coil qui se replient l'un sur l'autre de façon anti-parallèle et sont séparés par une jonction appelée région charnière. L'association des domaines N et C terminaux forme un domaine appelé « tête ». Le domaine N-terminal est composé d'un motif Walker A et d'un motif de liaison à l'ADN. Le domaine C terminal est composé d'un motif Walker B et d'un motif signature d'une activité ATPasique. Ces 2 motifs Walker A et B sont des motifs de liaison aux nucléotides et contribuent à la liaison à l'ATP et à son hydrolyse [pour revue (Hirano, 2002)] (**Figure 16**).

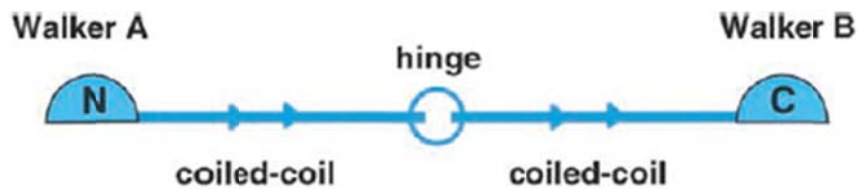


Figure 16 : Organisation en domaines des protéines de la famille SMC [d'après (Hirano, 2002)].

Certaines protéines de la famille SMC sont associées à des protéines accessoires pour assurer leurs fonctions. Une de ces protéines accessoires, appelée « kleisin » forme un pont entre les domaines globulaires des protéines de la famille SMC et interagit avec une ou plusieurs protéines accessoires ((Michaelis *et al.*, 1997, Yamazoe *et al.*, 1999, Mascarenhas *et al.*, 2002, Nasmyth & Haering, 2005). On peut aussi noter que la structure des complexes formés par les protéines SMC et leurs protéines accessoires est dynamique, dépendant de l'ATP et de son hydrolyse. Ce sont les processus successifs de fixation et d'hydrolyse de l'ATP qui font s'ouvrir et se refermer le complexe et lui donne une conformation en « V » ou en « O » (Melby *et al.*, 1998, Hirano & Hirano, 2002, Hirano *et al.*, 2001)] (**Figure 17**).

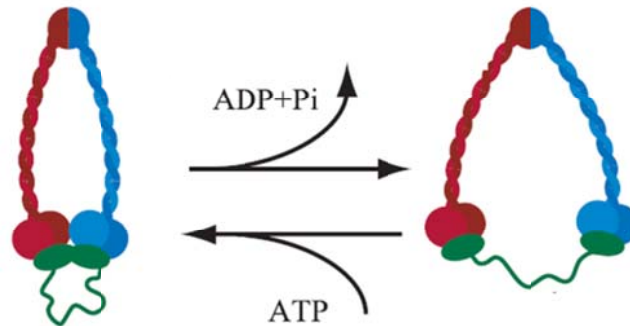


Figure 17 : L'hydrolyse de l'ATP modifie la structure des complexes formés par les protéines SMC et leurs protéines accessoires [d'après (Nasmyth & Haering, 2005)].

Les protéines de la famille SMC et leurs protéines accessoires ont la capacité de fixer l'ADN. Un complexe peut soit se lier à 2 régions d'ADN au sein de la même molécule d'ADN, dans ce cas, on dit qu'elles ont une activité de condensine, ou appartenant à des molécules différentes, structurant ainsi le chromosome, dans ce cas, on dit alors qu'elles ont une activité de cohésine (Hirano, 1999) (**Figure 18**).

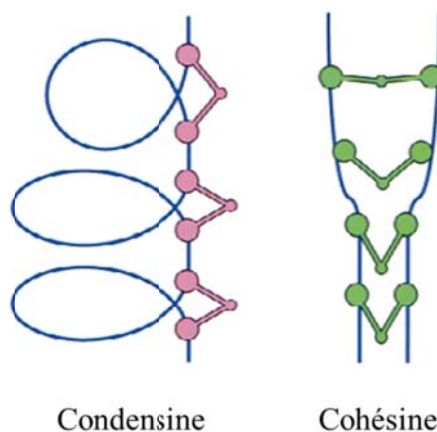


Figure 18 : Interactions des complexes SMC avec l'ADN [d'après (Hirano, 1999)].

Les protéines de la famille SMC peuvent se répartir en 3 sous-familles : la sous-famille Smc/MukB, la sous-famille Rad50/SbcC et la sous famille RecN (Graumann & Knust, 2009, Jessberger, 2002, Strunnikov, 2006).

(2) Protéines de la sous famille Smc/MukB

Chez les bactéries, les protéines Smc s'associent en homodimères et ont été décrites comme étant des condensines, Chez *E. coli*, la protéine MukB est associée aux protéines MukE et MukF alors que la protéine Smc de *B. subtilis* fonctionne en complexe avec ScpA et ScpB (Figure 19).

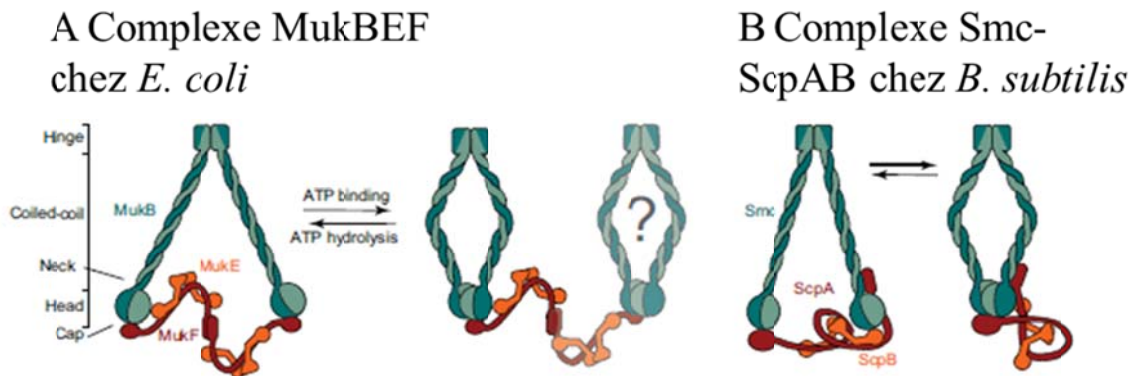


Figure 19 : Architecture des complexes Smc et leurs protéines accessoires [d'après (Nolivos & Sherratt, 2014)].

Chez les bactéries *E. coli*, *B. subtilis* et *Caulobacter crescentus*, les protéines Smc ne sont pas essentielles mais leur absence entraîne de nombreux défauts, tels que des retards de croissance, une thermosensibilité, des anomalies de ségrégation et de condensation des chromosomes, et une proportion importante de cellules anucléées ou qui ont un nucléoïde diffus est observé (Britton *et al.*, 1998, Graumann *et al.*, 1998, Jensen & Shapiro, 1999, Jensen & Shapiro, 2003).

Chez *E. coli*, les mutants $\Delta mukB$ présentent 100 fois plus de cellules anucléées qu'une souche sauvage, conséquence directe ou indirecte d'un défaut de ségrégation des chromosomes (Yamanaka *et al.*, 1996). Le même phénotype est observé pour les mutants dans les gènes codant pour les protéines accessoires MukE et MukF. Une interaction physique directe a été montrée *in vitro* et *in vivo* entre la protéine MukB et la topoisomérase IV d'*E. coli* (Hayama & Mariani, 2010). Cette association permet une coordination entre la décaténation et la ségrégation des chromosomes (Hayama & Mariani, 2010, Li *et al.*, 2010) (Figure 20).

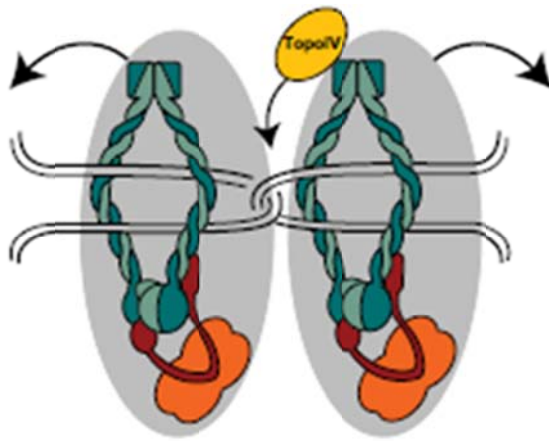


Figure 20 : Coordination entre la décaténation et la ségrégation des chromosomes chez *E. coli* [d'après (Nolivos & Sherratt, 2014)].

Chez *C. crescentus*, l'absence de Smc entraîne une modification de l'organisation des chromosomes avec une localisation modifiée de l'origine et du terminus de réplication dans la cellule (Jensen & Shapiro, 1999).

Chez les organismes eucaryotes, les protéines Smc s'associent de façon hétérodimérique et ont été classées en 3 catégories : les Smc impliquées dans la cohésion des chromatides sœurs (Smc1/Smc3), dans la condensation des chromosomes (Smc2/Smc4) et dans la réparation de l'ADN et la recombinaison (Smc5/Smc6) (Hirano, 1999, Jessberger, 2002). Comme pour les bactéries, les protéines Smc eucaryotes fonctionnent avec des protéines accessoires « kleisin ». Par exemple, dans le cas du complexe Smc1/Smc3 qui joue un rôle dans la cohésion des chromatides sœurs, la protéine accessoire est Scc1 (Nolivos & Sherratt, 2014) (**Figure 21**).

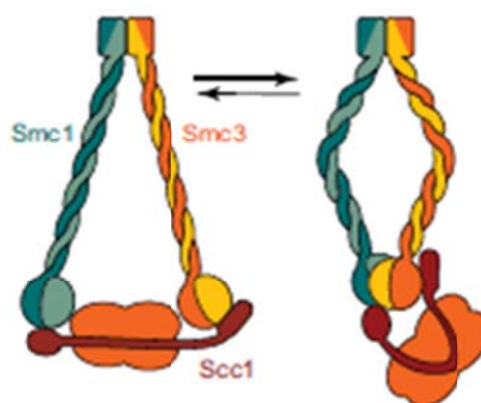


Figure 21 : Complexe Smc eucaryote [d'après (Nolivos & Sherratt, 2014)].

(3) Protéines de la sous famille SbcC/Rad50

Les protéines de la sous famille SbcC/Rad50 sont considérées du fait de leur structure comme des protéines Smc-like (**Figure 22**).

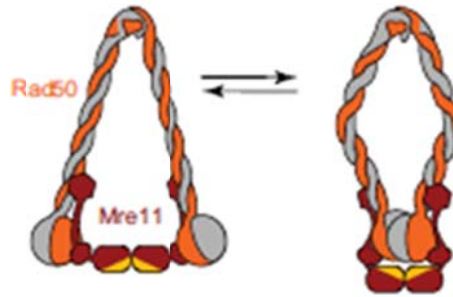


Figure 22 : Architecture du complexe Rad50/Mre11 [d'après (Nolivos & Sherratt, 2014)]

Les protéines de cette famille sont décrites comme impliquées dans la réparation de l'ADN. Chez les eucaryotes, le complexe Rad50/Mre11 est impliqué dans la réparation des cassures de l'ADN. Le complexe intervient dans la recombinaison homologe mais également dans le NHEJ, ainsi que dans le maintien des télomères ou dans certaines étapes de la méiose (Le *et al.*, 1999, Paques & Haber, 1999, Moore & Haber, 1996). Chez la levure *S. cerevisiae* le complexe Rad50/Mre11 fonctionne avec la protéine Xrs2 et est impliquée dans les premières étapes de détection des cassures double brin de l'ADN (Lisby & Rothstein, 2004). Dans les cellules humaines, le complexe Rad50/Mre11 fonctionne avec la protéine Nbs1.

Chez *E. coli*, le complexe SbcCD a été décrit comme impliqué dans la réparation des structures en épingle à cheveux qui peuvent être rencontrées dans des régions du chromosome qui contiennent de longues séquences palindromiques et qui peuvent provoquer des arrêts de réplication de l'ADN (Connelly *et al.*, 1998). Il a aussi été montré que l'activité exonucléase 3'-5' pourrait engendrer des extrémités 3' simple brin (Connelly *et al.*, 1999). Cromie et Leach ont également montré que la réparation des cassures de l'ADN engendrées par l'endonucléase *EcoKI* nécessite la présence de SbcCD (Cromie & Leach, 2001).

Chez *B. subtilis*, le complexe SbcCD est impliqué dans la réparation des pontages inter-brins de l'ADN qui peuvent conduire à la formation de cassures double brin de l'ADN (Mascarenhas *et al.*, 2006). Une délétion du gène *sbcC* engendre une légère diminution de la survie après exposition aux rayonnements ionisants ou traitement à la mitomycine C (Mascarenhas *et al.*, 2006).

(4) Protéines de la sous famille RecN

La protéine RecN possède la structure caractéristique des protéines de la famille SMC : un domaine « tête » qui associe les régions N et C terminales reliées entre elles par une longue région coiled-coil. RecN est active sous forme de dimère (Hirano, 2002) (**Figure 23**).

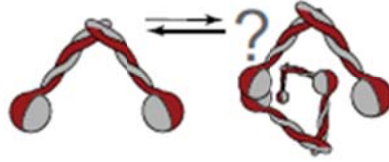


Figure 23 : Architecture et association de RecN [d'après (Nolivos & Sherratt, 2014)]

La structure coiled-coil est cependant plus courte pour RecN que pour les autres protéines de la famille SMC (240 acides aminés pour RecN contre 900 acides aminés pour les protéines SMC) (Graumann & Knust, 2009) et la rigidité de la région coil-coiled pourrait défavoriser l'interaction entre les 2 « têtes » d'un dimère mais pourrait favoriser l'interaction entre 2 dimères, permettant ainsi la polymérisation de RecN sur l'ADN. Contrairement aux autres protéines SMC, il n'a pas été identifié d'interaction entre la protéine RecN et des protéines accessoires de type « kleisines ».

RecN est impliquée dans la réparation des cassures double brin de l'ADN chez *B. subtilis*. En étant recrutée très tôt après apparition des cassures, elle permet ensuite le recrutement des protéines de recombinaison RecF et RecO puis RecA pour former les centres de réparation (Mascarenhas *et al.*, 2006, Kidane *et al.*, 2004). La protéine RecN a été proposée comme un senseur des cassures de l'ADN, voire un analogue du complexe Rad50/Mre11 chez les eucaryotes (Mascarenhas *et al.*, 2006). Il a également été montré que RecN se localise au niveau des cassures double brin de l'ADN (Kidane *et al.*, 2004, Sanchez *et al.*, 2006). Un mutant de délétion $\Delta recN$ chez *B. subtilis* est très sensible aux rayonnements γ et à la mitomycine C ainsi qu'à l' H_2O_2 , mais est modérément sensible aux lésions engendrées par les UV (Mascarenhas *et al.*, 2006, Kidane *et al.*, 2004). Un double mutant $\Delta recN \Delta sbcC$ a une sensibilité accrue aux rayonnements γ par rapport à celle des simple mutants pris séparément, ce qui suggère des fonctions distinctes des 2 protéines (Mascarenhas *et al.*, 2006). De plus, la protéine SbcC n'est pas colocalisée avec RecN chez *B. subtilis* en présence de dommages de l'ADN, ce qui pose la question de leur rôle respectif dans la cellule (Mascarenhas *et al.*,

2006). *In vitro*, RecN se fixe sur de l'ADN simple brin sous forme d'octamère et protège les extrémités 3'OH de la dégradation par les exonucléases (Sanchez & Alonso, 2005).

Chez la bactérie *E. coli*, l'ordre de recrutement des protéines au niveau des cassures n'est pas le même que chez *B. subtilis*. En effet, c'est la protéine RecA qui permet le chargement de RecN au niveau des cassures double brin (Keyamura *et al.*, 2013). Dans des conditions normales de culture, en absence de stress génotoxique, les cellules dépourvues de RecN présentent des phénotypes tout à fait normaux, similaires à une souche sauvage. En revanche, ces cellules mutantes sont très sensibles à la mitomycine C et présentent des nucléoïdes anormaux et diffus (Keyamura *et al.*, 2013).

(5) Chez *D. radiodurans*

Chez la bactérie *D. radiodurans*, 3 protéines appartiennent à la famille SMC, la protéine SMC (DR_1471), la protéine SbcC (DR_1922) et la protéine RecN (DR_1477). Chez *B. subtilis* les protéines SMC s'associent aux protéines ScpA et ScpB. Chez *D. radiodurans*, on retrouve uniquement les gènes codant pour les protéines SMC et ScpB mais celui codant ScpA est absent (**Tableau 1**).

-SMC : Contrairement à ce qui a été observé chez *B. subtilis* ou *E. coli* en absence respectivement de SMC ou MukB, les cellules de *D. radiodurans* dépourvues de SMC ont un phénotype similaire à celui des cellules sauvages et on n'observe pas d'augmentation du nombre de cellules anucléées, ce qui suggère que SMC n'est pas impliquée dans la ségrégation des chromosomes chez *D. radiodurans*. Les cellules dépourvues de cette protéine ne présentent pas non plus de sensibilité aux rayonnements γ et conservent une radiorésistance similaire à la souche sauvage (Bouthier de la Tour *et al.*, 2009). En revanche, les cellules mutantes Δsmc sont sensibles à des inhibiteurs de gyrase comme l'acide nalidixique et la novobiocine (Bouthier de la Tour *et al.*, 2009).

-SbcC : Le rôle du complexe SbcCD dans la radiorésistance de la bactérie *D. radiodurans* a été étudié au laboratoire (Bentchikou *et al.*, 2007). Il a été montré qu'une délétion de l'opéron *sbcCD* entraîne une diminution de la résistance aux radiations pour des doses d'irradiations supérieures à 10 kGy. Cela suggère que le complexe est nécessaire pour réparer les cassures double brin de l'ADN lorsque celles-ci sont en nombre très important et que l'ensemble des mécanismes de réparation de l'ADN est mobilisé dans la cellule. SbcC pourrait participer à un

système de réparation de renfort qui serait actif lorsque les cellules subissent un trop grand nombre de lésions de l'ADN ou bien lorsque les lésions sont difficiles à réparer par les systèmes classiques (Bentchikou *et al.*, 2007). De la même manière que pour le mutant Δsmc , le mutant $\Delta sbcCD$ est sensible aux inhibiteurs de gyrase, comme l'acide nalidixique et la novobiocine (Bouthier de la Tour *et al.*, 2009). Les cellules doubles mutantes $\Delta smc \Delta sbcCD$ présentent une sensibilité accrue à ces inhibiteurs de gyrase, en comparaison aux sensibilités des simples mutants prises séparément (Bouthier de la Tour *et al.*, 2009).

-RecN : Chez *D. radiodurans*, les premiers travaux sur RecN concernaient l'identification d'un mutant ponctuel de *recN*. La mutation est localisée dans la séquence codante du gène *recN* proche de l'extrémité 3' et engendre une plus grande sensibilité aux rayonnements γ que celle de la souche sauvage (Funayama *et al.*, 1999). Cette mutation conduit à la synthèse d'une protéine tronquée de 47 acides aminés en sa partie C-terminale. Les travaux poursuivis par cette équipe ont montré qu'un mutant $\Delta recN$ avait le même phénotype, les cellules mutantes présentant une sensibilité accrue aux rayonnements γ , aux rayonnements UV et à la mitomycine C (Funayama *et al.*, 1999). Des études *in vitro* menées sur la protéine RecN de *D. radiodurans* montrent que RecN a la capacité d'hydrolyser de l'ATP et de stimuler la ligation de fragments d'ADN linéaires et de garder proches les extrémités des molécules d'ADN (Reyes *et al.*, 2010, Pellegrino *et al.*, 2012c).

Plus récemment, la structure cristallographique du domaine tête et du domaine coil-coiled et une caractérisation biochimique de la protéine RecN de *D. radiodurans* ont permis de proposer un modèle d'action de la protéine dans la détection des cassures double brin (Pellegrino *et al.*, 2012b, Pellegrino *et al.*, 2012a, Pellegrino *et al.*, 2012c).

Les auteurs proposent un modèle dans lequel RecN, sous forme dimérique, reconnaîtrait les cassures double brin de l'ADN et garderait les extrémités proches l'une de l'autre (**Figure 24**). Il s'en suivrait une polymérisation d'autres molécules de RecN dépendante de la fixation de l'ATP créant un enroulement de multimères de RecN autour des cassures double brin de l'ADN. Ce modèle, fait intervenir une deuxième molécule d'ADN intacte et une fonction de cohésine de RecN. L'arrivée de la machinerie de réparation stimulerait l'hydrolyse de l'ATP et provoquerait un relargage des complexes multimériques de RecN qui pourraient ensuite être recyclés pour détecter de nouvelles cassures double brin de l'ADN. Si la réparation des cassures se fait par recombinaison, il faudrait supposer que RecN favorise le recrutement de protéines impliquées dans la maturation des extrémités et/ou le recrutement des protéines de

recombinaison RecF, RecO et RecA comme cela a été proposé chez *B. subtilis* pour former des centres de réparation (Mascarenhas *et al.*, 2006, Kidane *et al.*, 2004).

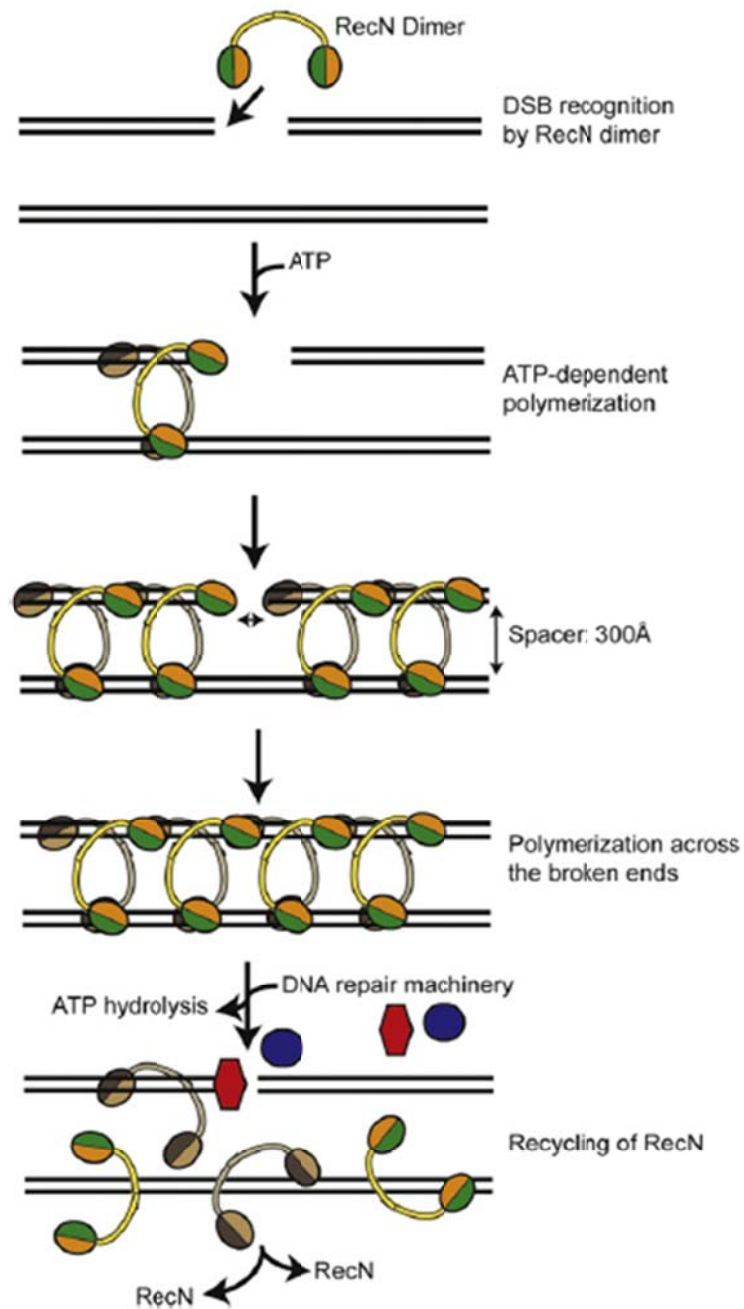


Figure 24 : Modèle du mode d'action de RecN dans la réparation des cassures double brin de l'ADN (Pellegrino *et al.*, 2012b).

C -Le surenroulement négatif

L'ADN sous forme double brin et circulaire s'enroule autour d'un axe hélicoïdal qui lui permet d'adopter une structure compacte. Les supertours qui structurent cette molécule peuvent être soit positifs (le surenroulement correspond au sens de rotation de la double hélice) soit négatifs (le surenroulement est inverse au sens de rotation de la double hélice) selon l'orientation qu'ils prennent autour de l'axe. Ces 2 types de supertours n'ont pas les mêmes conséquences sur la molécule d'ADN qu'ils structurent. Les supertours négatifs favorisent la séparation des 2 brins alors que les supertours positifs stabilisent la double hélice et empêchent l'ouverture de la molécule (Hsieh & Wang, 1975). Chez les bactéries, l'ADN est surenroulé négativement.

Les mécanismes biologiques nécessaires à la vie des cellules et à leur multiplication, comme la réplication, la transcription et la recombinaison, induisent de nombreuses contraintes sur l'ADN et les ADN topoisomérases, de par leurs activités, sont impliquées dans la résolution des contraintes topologiques générées lors de ces processus.

(1) Mode d'action des topoisomérases

Les ADN topoisomérases sont présentes chez tous les organismes dans les 3 domaines du vivant. Ces enzymes contrôlent les variations du surenroulement dans la molécule d'ADN en introduisant une coupure transitoire. Il existe 2 types d'ADN topoisomérases : les ADN topoisomérases de type I, qui effectuent une coupure transitoire sur un seul brin d'ADN : et les ADN topoisomérases de type II qui font des coupures transitoires sur 2 brins d'ADN et permettent ainsi le passage d'un second duplex d'ADN au travers de la coupure. La réaction qui permet aux topoisomérases de cliver un ou deux brins d'ADN est une réaction de trans-estérification. Le groupement tyrosine de l'enzyme attaque le groupement phosphate d'une liaison phosphodiester de l'ADN. Un brin d'ADN se retrouve ainsi coupé transitoirement et l'enzyme liée de manière covalente à l'extrémité du brin d'ADN. Un second brin d'ADN, intact cette fois-ci, peut alors passer au travers de la coupure réalisée sur l'autre brin d'ADN. Une seconde réaction de trans-estérification se produit pour refermer la coupure et reformer un ADN intact.

(2) Le rôle biologique des topoisomérases

Les ADN topoisomérases sont des protéines qui modulent le degré de surenroulement de l'ADN et interviennent dans la plupart des processus biologiques liés au métabolisme de

l'ADN dont la réplication, la transcription ou la recombinaison de l'ADN. Il existe une régulation homéostatique du surenroulement de l'ADN et de l'expression des gènes des topoisomérases pour que le niveau basal du surenroulement négatif soit maintenu chez les bactéries. Les ADN topoisomérases ont la capacité d'introduire ou relâcher des supertours dans l'ADN et/ou intervenir dans de la caténation/décaténation des chromosomes. Dans le cas des processus de réplication et de transcription, les ADN polymérase et ARN polymérase se déplacent sur l'ADN en créant des « bulles » d'ADN simple brin provoquant la séparation du duplex d'ADN (Liu & Wang, 1987). Cette séparation engendre l'introduction de supertours positifs en aval des machineries de réplication et de transcription, favorisant ainsi la stabilisation de l'ADN sous sa forme double brin, structure non favorable à la progression des « bulles » de réplication. (**Figure 25**).

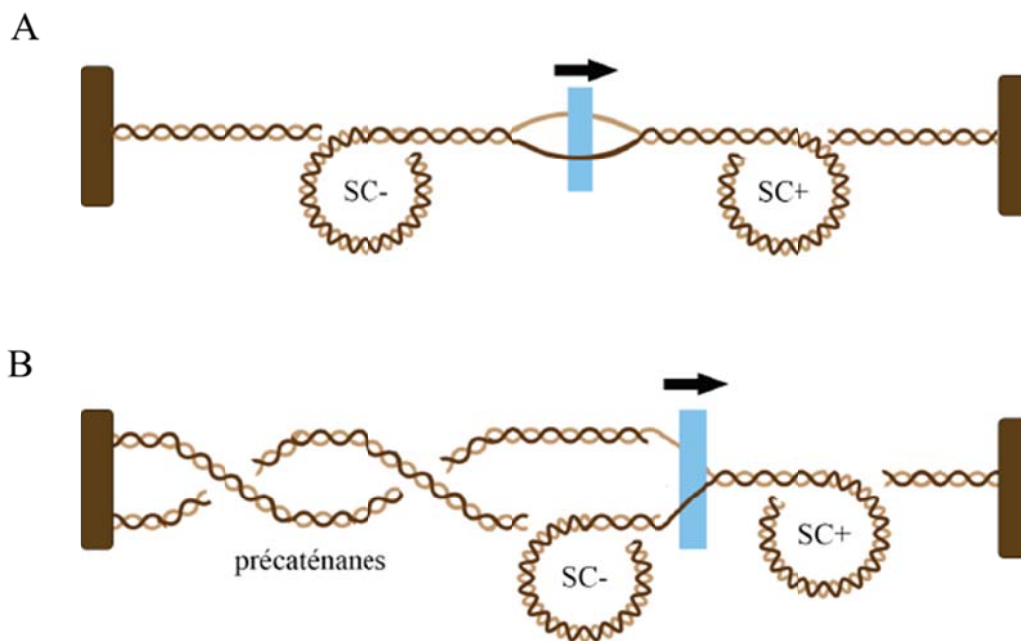


Figure 25 : Contraintes topologiques provoquées (A) par la machinerie de transcription : introduction de supertours positifs devant la machinerie et de supertours négatifs derrière la machinerie. (B) par la machinerie de réplication : introduction de supertours positifs devant la machinerie (D'après la thèse d'Emmanuelle Gigant (Gigant, 2012)).

Les ADN topoisomérases résolvent ces stress topologiques pour permettre la progression de la transcription et de la réplication. Elles relâchent les tensions accumulées en amont ou en aval de ces machineries. Elles permettent aussi de rétablir le surenroulement négatif après la réparation de l'ADN, et également de résoudre les caténanes issus de la réplication ou de la recombinaison pour permettre une bonne ségrégation des chromosomes dans les cellules filles (Wang, 1985).

Chez la bactérie *E. coli*, quatre ADN topoisomérases sont impliquées dans le maintien de la topologie de l'ADN et/ou la ségrégation des chromosomes: deux ADN topoisomérases de type I : l'ADN topoisomérase I (aussi appelée protéine ω) et l'ADN topoisomérase III ; et deux ADN topoisomérases de type II : l'ADN gyrase et l'ADN topoisomérase IV. Pour réguler le niveau de surenroulement global, la gyrase et l'ADN topoisomérase I ont des activités antagonistes : l'ADN topoisomérase I relâche l'excès de surenroulement négatif, l'ADN gyrase relâche l'excès de surenroulement positif et introduit des supertours négatifs. *In vitro*, la TopoIII possède une activité de décaténation et une faible activité de relaxation de surenroulements négatifs (DiGate & Marians, 1992). *In vivo*, des expériences suggèrent que la TopoIII jouerait un rôle dans la ségrégation des chromosomes (Perez-Cheeks *et al.*, 2012). *In vitro*, l'ADN topoisomérase IV relâche l'ADN surenroulé positivement et négativement mais ne peut pas introduire de surenroulement négatif comme la gyrase (Crisona *et al.*, 2000, Hsieh *et al.*, 2004). *In vivo*, elle participe à la décaténation des chromosomes (Hiasa & Marians, 1996, Ullsperger & Cozzarelli, 1996). Dans le paragraphe suivant, le rôle des deux ADN topoisomérases de type II, la TopoIV et la gyrase sera décrit de façon plus approfondie.

(3) ADN topoisomérase IV et ADN gyrase

Chez *E. coli*, les principales topoisomérases impliquées dans les différentes étapes de la réplication sont l'ADN Topoisomérase IV et l'ADN gyrase. Elles appartiennent toutes les 2 aux ADN topoisomérases de type II et réalisent donc des coupures transitoires sur les 2 brins d'ADN en même temps.

-l'ADN gyrase : est composée de 2 sous unités GyrA et GyrB, codées par les gènes *gyrA* et *gyrB* respectivement, et est fonctionnelle sous forme d'hétérotétramère. La sous unité GyrA porte le site de liaison à l'ADN et le site catalytique qui réalise la coupure et la refermeture sur l'ADN. La sous unité GyrB possède l'activité ATPasique. L'ADN gyrase est présente chez les bactéries, les archées, les plantes mais est absente dans les cellules humaines, ce qui en fait une cible privilégiée dans le traitement d'infections bactériennes (Gellert *et al.*, 1976,

Sioud *et al.*, 1988). L'ADN gyrase est essentielle chez *E. coli* (Drlica & Zhao, 1997). C'est la seule enzyme à pouvoir introduire des supertours négatifs dans l'ADN (Gellert *et al.*, 1976).

-l'ADN topoisomérase IV (TopoIV) : Chez *E. coli* TopoIV est composée de 2 sous unités, ParC et ParE, codées par les gènes *parC* et *parE* respectivement. L'enzyme est active et fonctionnelle sous forme hétérodimérique. La sous unité ParC possède l'activité de liaison et le site catalytique qui réalise la coupure sur l'ADN, ParE porte l'activité ATPasique. La TopoIV a la capacité de relâcher des supertours positifs et négatifs. Elle présente aussi une activité de décaténation très efficace chez *E. coli* et a été montrée responsable de la séparation topologique des chromosomes frères au cours de la ségrégation et de la partition des chromosomes (Hiasa & Marians, 1996, Ullsperger & Cozzarelli, 1996, Peng & Marians, 1993). L'activité de la TopoIV est contrôlée au cours du cycle cellulaire. Sa régulation se fait à la fois dans l'espace de la cellule et dans le temps, au cours du cycle cellulaire. En effet, les 2 sous unités ParC et ParE ne se localisent pas initialement aux mêmes endroits dans la cellule. La sous unité ParC se localise au niveau des machineries de réplication, en association à l'ADN polymérase III et forme des foci. La sous unité ParE n'apparaît pas au niveau des machineries de réplication mais apparaît aux pôles et au centre des cellules, dans des zones dépourvues d'ADN. L'assemblage des sous unités ParC et ParE se fait en fin de réplication et son activation se fait au moment de la division cellulaire précisément en interagissant directement avec FtsK, protéine impliquée dans la division cellulaire (Espeli *et al.*, 2003a, Espeli *et al.*, 2003b). Il a également été montré que la TopoIV effectue les clivages sur l'ADN préférentiellement proches des sites *dif* (Hojgaard *et al.*, 1999). La TopoIV interagit physiquement avec la protéine MukB d'*E. coli* et cette dernière stimule l'activité de décaténation de la TopoIV (Li *et al.*, 2010, Hayama & Marians, 2010). Il a été montré que la TopoIV interagit aussi avec l'homologue de l'actine bactérienne, la protéine MreB. MreB semble nécessaire à l'activité de décaténation de l'enzyme (Madabhushi & Marians, 2009). Enfin, la protéine SeqA, protéine qui empêche la sur-initiation de la réplication, interagit avec la TopoIV et stimule son activité de décaténation (Kang *et al.*, 2003). Les travaux menés sur cette interaction entre SeqA et TopoIV ont suggéré que SeqA soit impliquée **1)** avant la réplication pour inhiber la sur-initiation de réplication, **2)** pendant la réplication en stimulant l'activité de décaténation de la TopoIV afin de résoudre les pré-caténanes proches de la fourche de réplication et **3)** à la fin de la réplication pour stimuler la décaténation de la TopoIV pour séparer les chromosomes nouvellement répliqués (Hiraga *et al.*, 1998, Onogi *et al.*, 2000, Weitao *et al.*, 1999, Weitao *et al.*, 2000, von Freiesleben *et al.*, 2000).

Chez *E. coli*, il a été montré que lorsque l'ADN gyrase est inhibée, les activités de la topoisomérase IV sont aussi presque toutes inhibées (Zechiedrich *et al.*, 1997). La topoisomérase IV est la principale décaténase chez *E. coli* et sa fonction dépend du degré de surenroulement de l'ADN. Il a été proposé que l'ADN gyrase, en introduisant des supertours négatifs dans l'ADN, permette de créer de meilleurs substrats pour la topoisomérase IV (Zechiedrich *et al.*, 1997). Ces observations montrent une étroite collaboration entre les 2 topoisomérases.

(4) Les ADN topoisomérases chez *D. radiodurans*

Chez *D. radiodurans* on trouve deux gènes codant les deux sous-unités de l'ADN gyrase, *gyrA* (DR_1913) et *gyrB* (DR_0906), un gène *topIA* (DR_1374) codant pour la topoisomérase IA. En revanche, on ne trouve pas les gènes codant pour l'ADN topoisomérase IV ni pour l'ADN topoisomérase III. De manière inattendue un gène *topB* qui code pour une topoisomérase IB de type eucaryote, similaire à l'ADN topoisomérase du virus de la vaccine est présent chez cette bactérie. Cette topoisomérase est rarement retrouvée chez les bactéries ((Krogh & Shuman, 2002, Makarova *et al.*, 2001). L'ADN gyrase de *D. radiodurans* est essentielle à la viabilité cellulaire (Lecointe *et al.*, 2004a, Nguyen *et al.*, 2009).

V Ségrégation du chromosome bactérien

La ségrégation des chromosomes bactériens est un processus crucial dans le cycle de division cellulaire qui permet d'assurer une répartition correcte de l'ADN nouvellement répliqué dans les cellules filles et donc d'assurer la pérennité de l'information génétique au cours des générations. Du fait de leur grande taille, il a été possible de comprendre très tôt grâce à la microscopie optique les étapes de la mitose eucaryote. Il faudra attendre les avancées techniques de microscopie à fluorescence pour comprendre le processus de division cellulaire et particulièrement les observations des comportements des nucléoïdes bactériens durant ce processus. Les travaux menés sur la ségrégation des chromosomes chez différents modèles bactériens ont pu mettre en évidence qu'elle se déroulait en 3 étapes: tout d'abord les origines de répllication sont séparées rapidement et relocalisées dans la cellule, puis la plus grande partie du chromosome (appelée « corps ») est séparée progressivement, et enfin, les

régions terminus de réplication sont à leur tours séparées après une période de cohésion plus longue (Espeli *et al.*, 2008, Nielsen *et al.*, 2006, Viollier & Shapiro, 2004).

A -Ségrégation des origines de réplication

Les origines de réplication nouvellement répliquées sont maintenues proches et colocalisent puis sont rapidement séparées. Principalement 2 types de mécanismes semblent être impliqués dans la ségrégation des régions origine de réplication, 1 système actif, le système parABS, et 1 système plus passif, la force générée par les ARN polymérases.

(1) Système parABS :

Il est important de noter qu'il n'existe pas de système de type ParABS chez la bactérie *E. coli*. Il a cependant été identifié un site centromérique potentiel *migS* mais aucune protéine associée lui est connue à ce jour (Fekete & Chattoraj, 2005, Yamaichi & Niki, 2004).

Les systèmes ParABS sont impliqués dans la ségrégation des régions origines de plusieurs espèces bactériennes. La perturbation du système engendre des problèmes de ségrégation ainsi que des défauts de croissance chez *B. subtilis*, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que chez *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium smegmatis* (Godfrin-Estevenon *et al.*, 2002, Bartosik *et al.*, 2004, Jakimowicz *et al.*, 2007, Maloney *et al.*, 2009).

Le système ParABS est composé de 2 protéines et d'une séquence cible sur l'ADN, la séquence *parS*. La protéine ParA qui est une ATPase, la protéine ParB qui présente un domaine HTH (Helix Turn Helix) et qui est impliquée dans la fixation spécifique à l'ADN au niveau des sites *parS*. Il est possible que cette protéine permette l'autorégulation de l'opéron *parAB* en se fixant sur un site *parS* dans la région promotrice de l'opéron. Les sites *parS* sont des séquences palindromiques de 16 paires de bases. Ces sites sont présents en nombre allant de 1 à plus de 20 copies et sont dispersés dans la région origine.

L'implication du système ParABS dans la ségrégation des régions origines de réplication a été démontrée chez plusieurs bactéries modèles. C'est le cas chez *B. subtilis* chez qui ParA et ParB sont respectivement Soj et Spo0J (Lee & Grossman, 2006). Les mutations dans les

protéines du système ParABS engendrent la présence de cellules anucléées ainsi que des perturbations du positionnement de l'origine de réplication dans les cellules, mais seulement dans le cas des doubles mutants $\Delta parA \Delta parB$. Les simples mutants ne génèrent pas ou peu de cellules annulées (Ireton *et al.*, 1994, Lee & Grossman, 2006). Chez la bactérie modèle *C. crescentus* dont le cycle cellulaire est très particulier puisqu'il produit 2 cellules filles différentes, une est fixée au support alors que l'autre est mobile, dotée d'un flagelle, ce système de ségrégation des régions origines est essentiel à la viabilité cellulaire (Mohl & Gober, 1997, Figge *et al.*, 2003). La localisation des sites *parS* dans la région origine permet la ségrégation active de cette région mais il semble que le système ParABS puisse être impliqué dans d'autres processus que celui de la ségrégation : initiation de la réplication (Lee & Grossman, 2006, Murray & Errington, 2008), structuration du chromosome (Britton *et al.*, 1998, Gruber & Errington, 2009, Sullivan *et al.*, 2009) et division cellulaire (Mohl *et al.*, 2001, Thanbichler & Shapiro, 2006).

Chez *D. radiodurans*, le chromosome I contient tous les homologues du système de ségrégation ParABS (3 séquences putatives *parS*, un homologue de ParA et un homologue de ParB). Il a été observé chez un mutant $\Delta parB1$ un défaut de croissance ainsi que un taux plus élevé (13%) de cellules anucléées en comparaison à celui mesuré dans une souche sauvage (<1%) (Charaka & Misra, 2012).

(2) Ségrégation par la force des ARN polymérases :

Il a en effet été proposé que la force exercée par les ARN polymérases au cours de la transcription permette une ségrégation des régions origines au moment de la réplication. On retrouve aux environs des régions origines des gènes dont le taux d'expression est élevé. La transcription de ces gènes débutant alors qu'ils viennent d'être répliqués pourrait contribuer à la ségrégation de ces régions (Dworkin & Losick, 2002).

B -Ségrégation du corps du chromosome

(1) Compaction de l'ADN

Le long des réplichores, l'ADN est compacté. Cette compaction est initiée à partir des origines de réplication et se poursuit le long des réplichores. Cette compaction implique essentiellement les protéines SMC, les protéines de type histone-like et aussi le

surenroulement de l'ADN. La colocalisation de Smc (ou MukBEF) avec l'origine de réplication est fréquente chez *E. coli* ainsi que chez *B. subtilis* et *C. crescentus*, ce qui appuie l'implication de ces protéines dans ce processus (Nicolas *et al.*, 2014, Mascarenhas *et al.*, 2002, Jensen & Shapiro, 1999). En revanche, ça ne semble pas être le cas chez *D. radiodurans* car les cellules dépourvues de SMC ne présentent aucun phénotype particulier de décompaction de l'ADN (Bouthier de la Tour *et al.*, 2009).

(2) Cytosquelette MreB bactérien

La forme en bâtonnet de certaines bactéries est liée à la présence de la protéine MreB, qui est une ATPase de type actine et forme des filaments discontinus contre la membrane interne des cellules (Jones *et al.*, 2001, Carballido-Lopez *et al.*, 2006). Les mutants dépourvus de cette protéine adoptent des formes sphériques et ont des problèmes de ségrégation des chromosomes (Jones *et al.*, 2001). L'implication de MreB dans la ségrégation des chromosomes a été montrée en lien avec l'ADN topoisomérase IV chez *E. coli*. En effet, MreB et TopoIV interagissent et il a été montré que MreB permettait l'activation de TopoIV ainsi qu'elle stimulerait son activité de décaténation (Madabhushi & Marians, 2009). En absence de MreB chez *E. coli*, l'activité de TopoIV n'est pas suffisante pour correctement décaténer les 2 chromosomes répliqués qui restent entremêlés et les systèmes de ségrégation ne parviennent pas à les séparer (Madabhushi & Marians, 2009). Chez *D. radiodurans* qui est une bactérie en forme de coque, MreB n'est pas présente alors qu'elle l'est chez *D. deserti* qui elle a une forme en bâtonnet.

(3) Expulsion par le réplisome :

Au début de la découverte de la réplication, le réplisome semblait jouer un rôle dans l'expulsion des ADN nouvellement répliqués vers les deux pôles de la cellule au fur et à mesure que la réplication progressait [pour revue (Lemon & Grossman, 2001)]. L'avancée des connaissances en ce qui concerne la dynamique des chromosomes et leur structure a écarté cette hypothèse, le réplisome n'est plus proposé comme facteur responsable de la ségrégation du corps du chromosome. De plus, un tel mécanisme ne serait pas capable de réduire les structures en caténanes générées par la réplication.

C -Ségrégation du Terminus

La ségrégation des régions terminus est l'ultime étape qui permettra de séparer complètement les 2 chromosomes nouvellement répliqués et permettra que les cellules filles produites par la suite aient chacune un exemplaire complet de chromosome.

La résolution des intercaténations est effectuée chez *E. coli* par l'ADN topoisomérase IV alors que la résolution des dimères de chromosomes est effectuée par le système de recombinaison Xer qui agit en des sites spécifiques. L'acteur clé qui régule ces deux étapes est la translocase FtsK [pour revue (Bigot *et al.*, 2007, Lesterlin *et al.*, 2004)]. Celle-ci est attachée au niveau de l'anneau de division cellulaire. La translocase FtsK a la particularité de pouvoir « lire » le sens du chromosome grâce à des séquences spécifiques portées par celui-ci et qui donne une orientation à l'ADN. Ces séquences, appelées KOPS (pour FtsK Orienting Polar Sequences) sont présentes en de nombreux endroits du chromosome et leur orientation est biaisée (Bigot *et al.*, 2005). La lecture de ces séquences KOPS par FtsK lui permet de tracter le chromosome et de le dégager au fur et à mesure de la formation du septum de division cellulaire en formation, afin d'éviter que celui-ci ne se referme et ne guillotine une partie de l'ADN encore présent. La TopoIV qui interagit avec FtsK démêle les chromosomes. FtsK se sert de l'orientation des KOPS pour positionner les termini de réplication et le site de résolution des dimères *dif* au septum de division. La résolution finale des dimères se fait lorsque 2 sites *dif* présents sur chacun des chromosomes se retrouvent piégés au niveau du septum. A ces sites *dif* est associé la recombinase spécifique XerCD. Lorsque les 2 sites *dif* se retrouvent face à face, FtsK active alors le système XerCD et la résolution du dimère se fait, séparant ainsi les 2 chromosomes définitivement (**Figure 26**) (Bigot 2005, Stouf 2013).

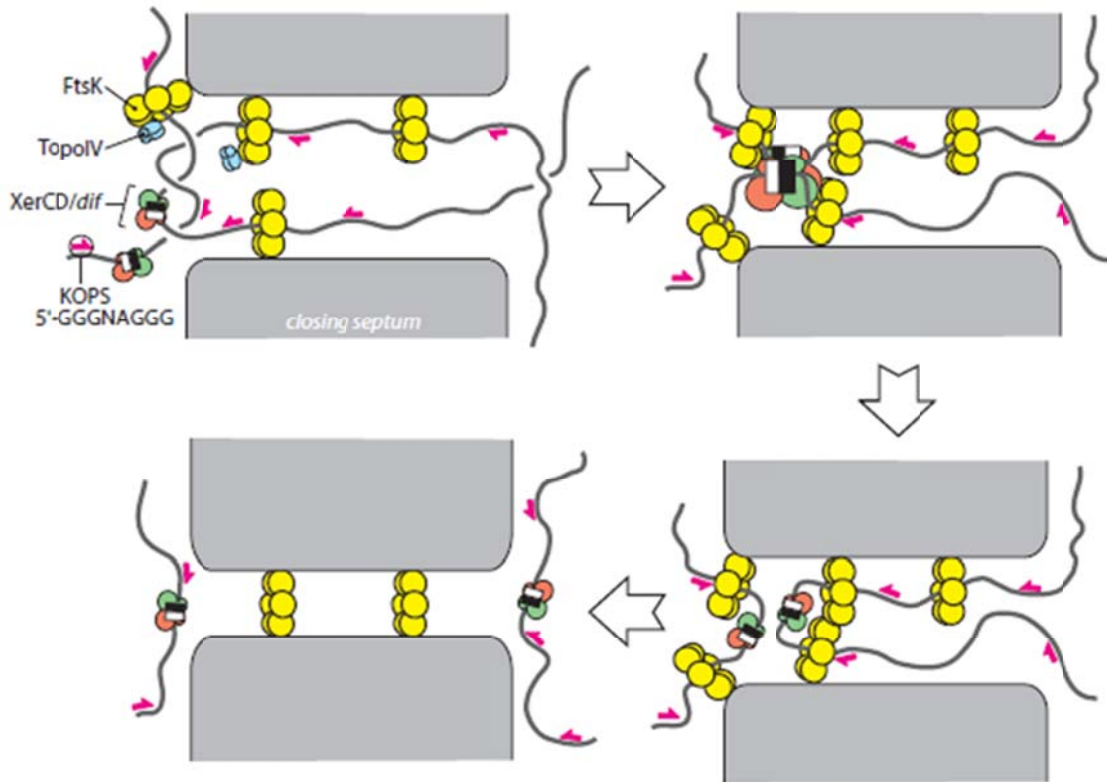


Figure 26 : Ségrégation de la région terminus lors de la résolution des dimères de chromosomes (Bigot 2007).

Il a également été observé une migration chez *E. coli* du macrodomaine Ter partant de la périphérie de la cellule vers le centre au moment de la réplication (Stouf *et al.*, 2013, Meile *et al.*, 2011, Espeli *et al.*, 2012). Cela suggère que la réplication tire ou entraîne la région Ter vers le septum de division cellulaire. Il a également été montré que cette région terminus est maintenue au centre de la cellule par le système MatP/*matS* qui interagit avec la protéine ZapB appartenant à la machinerie de division (Espeli *et al.*, 2012). Cette interaction maintient les macrodomaines Ter au septum de division.

Les protéines et systèmes impliqués dans la synthèse de la paroi, la ségrégation des chromosomes et la division cellulaire présents chez *D. radiodurans* sont récapitulés dans le **Tableau 2**.






Espèce	Forme	Synthèse paroi cellulaire et cytotinèse								Biologie des chromosomes et division cellulaire										
		MreB	MreC	MreD	FtsZ	FtsA	SlkP	EzrA	GpsB	DivIVA	MinC	MinD	MinE	MinJ	Noc	SlmA	ParA	ParB	Smc	FtsK
Firmicutes																				
<i>B. subtilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>		-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Procobactéries																				
<i>E. coli</i>		+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
<i>C. crescentus</i>		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Deinococcus-Thermus																				
<i>D. radiodurans</i>		-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+

Tableau 2 : Conservation des protéines impliquées dans la synthèse de la paroi, la ségrégation des chromosomes et la division cellulaire chez les organismes *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *C. crescentus* et *D. radiodurans* (D'après (Pinho et al., 2013)).

D –Cas des organismes multi-chromosomiques

La première bactérie identifiée comme porteuse d'un patrimoine génétique réparti sur plusieurs chromosomes est *Rhodobacter sphaeroides*. Cette découverte date de 1989 et des analyses en gel d'électrophorèse en champ pulsé ont révélé que le génome de cet organisme était réparti sur 2 chromosomes circulaires (Suwanto & Kaplan, 1989). D'autres bactéries possédant plusieurs chromosomes ont par la suite été identifiées. Parmi elles on peut citer *Agrobacterium tumefaciens* qui possède 1 chromosome circulaire et 1 chromosome linéaire (Allardet-Servent et al., 1993), *Burkholderia cenocepacia* qui possède 3 chromosomes circulaires (Rodley et al., 1995), *D. radiodurans*, qui présente 2 chromosomes circulaires, 1 méga-plasmide et 1 plasmide (White et al., 1999). Enfin, l'organisme bactérien le mieux étudié par rapport à cet aspect multi chromosomique est *Vibrio cholerae*, qui possède 2 chromosomes circulaires (Trucksis et al., 1998, Okada et al., 2005).

Le séquençage du génome de *V. cholerae* a révélé que la majorité des gènes essentiels au fonctionnement cellulaire et à la pathogénicité étaient portés par le chromosome I et que le chromosome II portait une grande partie des gènes codant pour des protéines de fonctions hypothétiques (Heidelberg et al., 2000). Les origines de réplication des 2 chromosomes sont différentes : celle du chromosome I présente les mêmes caractéristiques que celle du chromosome d'*E. coli*, alors que l'origine de réplication du chromosomes II est semblable à celles trouvées sur les plasmides d'*E. coli* (Heidelberg et al., 2000). Le chromosome II initie sa réplication plus tardivement que celle du chromosome I, cependant, leur réplication se termine en même temps. Ceci pourrait être expliqué de par la différence de taille entre les 2 chromosomes (Rasmussen et al., 2007).

Le chromosome I de *D. radiodurans* code pour un homologue de ParA et un homologue de ParB et contient 3 séquences putatives de sites *parS* (White *et al.*, 1999, Charaka & Misra, 2012). Le chromosome II contient également un opéron putatif *parAB* (White *et al.*, 1999). De récents travaux réalisés au laboratoire montrent que les différentes copies du chromosome I de *D. radiodurans* sont dispersées dans la cellule et ne présentent pas de pré-alignement particulier (Passot *et al.*, 2015). Le déroulement de la ségrégation des chromosomes chez *D. radiodurans* est encore loin d'être élucidé. Sa compréhension pourra être, plus que chez un autre organisme, difficile à appréhender, du fait d'un part de la composition de son génome réparti sur plusieurs éléments mais aussi du caractère multi-copie de celui-ci.

Problématique de la thèse

L'importante implication de la protéine PprA lorsque des dommages sont créés sur l'ADN chez la bactérie *D. radiodurans* a été démontrée à plusieurs reprises par différentes équipes (Tanaka *et al.*, 2004, Narumi *et al.*, 2004). Les cellules dépourvues de cette protéine présentent une grande sensibilité à différents agents qui endommagent l'ADN, comme par exemple les rayonnements ionisants, les UV ou encore la mitomycine C. Des expériences *in vitro* menées sur PprA en 2004 (Narumi *et al.*, 2004) ont suggéré une implication de la protéine dans un mécanisme de réparation de l'ADN de type NHEJ chez *D. radiodurans*. Une implication dans un tel mécanisme suggérerait également que PprA agirait dans une voie qui serait indépendante de la protéine RecA (Narumi *et al.*, 2004).

Une caractérisation plus approfondie du mutant $\Delta pprA$ s'imposait donc si on voulait comprendre mieux le rôle de cette protéine dans la radiorésistance chez *D. radiodurans*. De plus, bien que les cellules mutantes $\Delta pprA$ présentent une grande radiosensibilité, il n'avait jamais été montré une implication de PprA dans un mécanisme de réparation des cassures de l'ADN, qu'il s'agisse du NHEJ ou d'un autre mécanisme.

L'un des premiers objectifs de ma thèse était de poursuivre les investigations concernant le rôle de la protéine PprA dans la radiorésistance chez la bactérie *D. radiodurans* notamment en caractérisant plus finement le mutant $\Delta pprA$ et en testant l'implication potentielle de PprA dans un mécanisme RecA-indépendant. La caractérisation du mutant $\Delta pprA$ a donc été entreprise, et a permis de montrer que PprA joue un rôle crucial après endommagement de l'ADN à l'interface des systèmes de réparation, de ségrégation des chromosomes et de division cellulaire. Ces résultats seront présentés dans le chapitre 1 de la partie résultats.

Dans un second temps, un aspect de mon travail s'est attaché à déterminer le réseau d'interactants physique de la protéine PprA. Afin de nous éclairer quant au rôle de PprA, j'ai cherché à identifier les protéines partenaires. Cet aspect a nécessité la mise au point d'une technique permettant l'identification de ce réseau d'interactants par immunoprécipitation. Ce travail a aussi et surtout pu être réalisé en mettant en place une collaboration efficace avec le laboratoire de Jean Armengaud du CEA de Marcoule, ce travail nécessitant une analyse des protéines immunoprécipitées par spectrométrie de masse. Ces travaux sont présentés dans le chapitre 2 de la partie résultats et sont actuellement soumis à Nucleic Acid Research.

Un troisième axe de recherche a été initié : par une approche génétique, j'ai essayé d'établir une interaction de la protéine PprA avec les protéines de la famille SMC chez *D. radiodurans*, protéines connues pour être impliquées dans la ségrégation des chromosomes. Les résultats préliminaires de cette étude sont présentés dans le troisième chapitre de la partie résultats.

Enfin, l'étude structurale de PprA a été initiée en collaboration avec le laboratoire d'Herman van Tilbeurgh de l'IBBMC et plus particulièrement en étroite association avec Sophie Quevillon-Cheruel. Cette équipe a dans un premier temps effectué la purification de la protéine pour ensuite identifier des conditions permettant sa cristallisation dans le but de déterminer sa structure 3D et d'obtenir des informations sur les domaines importants de la protéine. Malheureusement, des difficultés ont été rencontrées très tôt dans le projet, la purification de la protéine recombinante s'étant révélée particulièrement difficile. Les difficultés se sont ensuite accrues lorsque les essais de cristallisation ont commencé, les conditions idéales de cristallisation de PprA n'ont pu être identifiées. Ces difficultés couplées au manque de « bras » au sein de nos deux équipes nous ont contraints à ne pas poursuivre cet aspect du projet, mais il aurait été extrêmement intéressant de pouvoir identifier d'éventuels domaines structuraux connus pour agir dans certains processus.

RESULTATS - DISCUSSION

Chapitre 1 :

La protéine PprA est nécessaire à la ségrégation des chromosomes après irradiation chez la bactérie *Deinococcus radiodurans*

Présentation de la problématique

La survie des cellules de *D. radiodurans* dépourvues de la protéine PprA est très affectée lorsqu'elles sont en présence d'agents qui endommagent l'ADN, comme par exemple les rayonnements ionisants, les UV ou encore la mitomycine C. Des expériences *in vitro* menées sur PprA en 2004 (Narumi *et al.*, 2004) ont suggéré une implication de la protéine dans un mécanisme de réparation de l'ADN de type NHEJ chez *D. radiodurans*. Il a été proposé que PprA soit un analogue fonctionnel du complexe Ku-DNAPKcs eucaryote chez *D. radiodurans*. Cette bactérie possède des analogues fonctionnels de la plupart des protéines impliquées dans le NHEJ. De plus, chez le mutant *ΔrecA*, on observe une réparation partielle des cassures double brin de l'ADN visible en champ pulsé suggérant une réparation par un mécanisme indépendant de RecA. Cependant, la fonctionnalité du NHEJ n'a jamais été mise en évidence expérimentalement chez cet organisme.

Afin de mieux comprendre le rôle de PprA chez *D. radiodurans*, nous avons cherché à caractériser plus finement un mutant $\Delta pprA$ en testant dans un premier temps l'implication potentielle de PprA dans un mécanisme RecA-indépendant en construisant et en analysant le double mutant $\Delta pprA\Delta recA$. La caractérisation du mutant $\Delta pprA$ a été poursuivie en analysant la morphologie ces cellules $\Delta pprA$ après irradiation afin de constater si elles présentaient un phénotype particulier compte tenu de leur grande radiosensibilité. Enfin, la localisation de la protéine avant et après irradiation a été réalisée. Certaines de ces expériences avaient déjà été entreprises au sein du laboratoire avant mon arrivée par Sofiane Mersaoui qui n'avait malheureusement pas eu l'opportunité de rester plus longtemps afin de les poursuivre. Les résultats obtenus sont présentés dans ce chapitre et ont fait l'objet d'une publication dans DNA Repair.

Article 1

The PprA protein is required for accurate cell division of γ irradiated *Deinococcus radiodurans* bacteria



The PprA protein is required for accurate cell division of γ -irradiated *Deinococcus radiodurans* bacteria

Alice Devigne¹, Sofiane Mersaoui^{1,2}, Claire Bouthier-de-la-Tour, Suzanne Sommer, Pascale Servant*

Univ. Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologie (Bât. 409), UMR8621, Orsay F-91405 France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 October 2012

Received in revised form 3 January 2013

Accepted 13 January 2013

Available online 9 February 2013

Keywords:

Deinococcus radiodurans

PprA protein

DNA repair

DNA segregation

Cell division

ABSTRACT

Deinococcus radiodurans, one of the most radioresistant organisms known to date is able to reconstruct an intact genome from hundreds of DNA fragments. Here, we investigate the *in vivo* role of PprA, a radiation-induced *Deinococcus* specific protein. We report that DNA double strand break repair in cells devoid of PprA and exposed to 3800 Gy γ -irradiation takes place efficiently with a delay of only 1 h as compared to the wild type, whereas massive DNA synthesis begins 90 min after irradiation as in the wild type, a phenotype insufficient to explain the severe radiosensitivity of the $\Delta pprA$ mutant. We show that the slow kinetics of reassembly of DNA fragments in a $\Delta pprA \Delta recA$ double mutant was the same as that observed in a $\Delta recA$ single mutant demonstrating that PprA does not play a major role in DNA repair through RecA-independent pathways. Using a tagged PprA protein and immunofluorescence microscopy, we show that PprA is recruited onto the nucleoid after γ -irradiation before DNA double strand break repair completion, and then is found as a thread across the septum in dividing cells. Moreover, whereas untreated cells devoid of PprA displayed a wild type morphology, they showed a characteristic cell division abnormality after irradiation not found in other radiosensitive mutants committed to die, as DNA is present equally in the two daughter cells but not separated at the division septum. We propose that PprA may play a crucial role in the control of DNA segregation and/or cell division after DNA double strand break repair.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Deinococcus radiodurans is one of the most radioresistant organisms known to date. This bacterium is also tolerant to other DNA-damaging agents such as UV radiation, repeated cycles of desiccation-rehydration and mitomycin C. The *D. radiodurans* bacterium is able to repair hundreds of DNA double-strand breaks (DSBs) while most bacteria can only repair 2 or 3 DNA DSBs (for review see [1–3]). The rapid reconstitution of an intact genome is dependent on two RecA-dependent mechanisms: the extended synthesis-dependent strand annealing (ESDSA) and homologous recombination [4,5]. The ESDSA mechanism is characterized by a massive DNA synthesis involving DNA polymerase III and I preceding reassembly of an intact genome [5]. As a partial mending of radiation-induced DNA double strand breaks takes place in RecA deficient *D. radiodurans* bacteria, it has been proposed that RecA-independent DNA double-strand break repair processes such

as single-strand annealing (SSA) [6–8] and non-homologous end-joining (NHEJ) [9,10] may operate.

Global analysis of *D. radiodurans* gene expression after irradiation or desiccation has mainly highlighted the strong induction of several genes specific of *Deinococcaceae* [11]. The inactivation of several of these genes, including *ddrA*, *ddrB* and *pprA*, showed that the proteins encoded by these genes play a crucial role in radioresistance [11]. *In vitro*, the DdrA protein binds to single-stranded DNA with a significant affinity for 3' ends and protects these ends from degradation by exonuclease I [12]. It has been suggested that DdrA is involved in the stability of recombination substrates, especially in the presence of a large number of DNA breaks [13]. *In vitro*, the DdrB protein binds with high affinity to single-stranded DNA and stimulates annealing of complementary single-stranded DNA [14,15]. *In vivo*, DdrB was shown to be required for transformation by plasmid DNA and recruited early and transiently after irradiation into the nucleoid. It has been proposed that DdrB facilitates the assembly of a myriad of small fragments by a single strand annealing (SSA) process generating suitable substrates for ESDSA [8].

Narumi et al. characterized a mutant (strain KH311) that exhibited a high sensitivity to γ -radiation, mitomycin C and UV-radiation and showed that a defect in the *pprA* gene was responsible for its loss of radiation resistance [9,16]. *In vitro*, PprA preferentially binds double-stranded DNA carrying strand breaks, inhibits

* Corresponding author at: Institut de Génétique et Microbiologie, Bâtiment 409, Université Paris-Sud. F-91405 Orsay, France. Tel.: +33 1 69 15 58 17; fax: +33 1 69 15 78 08.

E-mail address: pascale.servant@igmors.u-psud.fr (P. Servant).

¹ Co-first authors.

² Present address: University of Sherbrooke, Department of Microbiology and Infectiology, 3201 rue Jean-Mignault, J1E 4K8, Sherbrooke, Québec, Canada.

Escherichia coli exonuclease III activity and stimulates the DNA end-joining reaction catalyzed by ATP-dependent and NAD-dependent DNA ligases [9]. All together, these results suggested that the PprA protein may play a crucial role in NHEJ [9,17]. However, NHEJ has never been experimentally established in *D. radiodurans*.

Here, we have revisited the role of PprA in radioresistance. We have shown that the slow kinetics of reassembly of DNA fragments in a $\Delta pprA \Delta recA$ double mutant was the same than in a $\Delta recA$ single mutant, whereas the kinetics of DNA double strand break repair was only delayed of 1 h in a $\Delta pprA$ strain as compared to wild type, a delay insufficient to explain the severe radiosensitivity of the $\Delta pprA$ mutant bacteria. By immunofluorescence microscopy, we have shown that PprA protein is recruited early onto the nucleoid and localizes through the septum in dividing cells. In the absence of PprA, defects in DNA segregation and cell division were observed after completion of DNA repair.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, plasmids, oligonucleotides, media

Bacterial strains and plasmids are listed in Table 1. The *E. coli* strain DH5 α was used as the general cloning host, strain SCS110 was used to propagate plasmids prior to introduction into *D. radiodurans* via transformation [18]. All *D. radiodurans* strains were derivatives of the wild-type strain R1 ATCC 13939. Alleles $\Delta pprA\Omega cat$, $pprA::HA::kan$ were constructed by the tripartite ligation method [19]. 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.

Table 1
Bacterial strains and plasmids.

Bacterial strains	Description	Source or reference
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44</i> $\Delta lacU(\phi 80 lacZ \Delta M15)$ <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96</i> <i>thi-1 relA1</i>	Laboratory stock
SCS110	<i>endA dam dcm supE44</i> $\Delta(lac-proAB)$ (<i>F' traD36 proAB</i> <i>lacI^q Z \Delta M15</i>)	Laboratory stock
<i>D. radiodurans</i>		
R1	wild type, ATCC 13939	Laboratory stock
GY11944	R1/p11520	[27]
GY12251	$\Delta pprA\Omega cat$	This work
GY12362	$\Delta ddrA\Omega cat$ <i>amyE</i> $\Omega(P_{tufA}::lacI$ <i>kan)</i>	[13]
GY12835	$\Delta ddrB\Omega kan$	[8]
GY12968	$\Delta recA\Omega kan$	[22]
GY14604	$\Delta pprA\Omega cat \Delta recA\Omega kan$	This work
GY14615	<i>pprA::HA\Omega kan</i>	This work
GY14623	$\Delta pprA\Omega cat/p11520$	This work
GY14625	$\Delta pprA\Omega cat/p15802$	This work
GY14627	$\Delta pprA\Omega cat/p11559$	This work
GY14643	$\Delta pprA\Omega cat/p15801$	This work
Plasmids		
p11086	Source of kanamycin cassette in <i>D. radiodurans</i>	Laboratory stock
p11520	Shuttle vector <i>E. coli</i> / <i>D. radiodurans</i> , <i>Spc^R</i>	Laboratory stock
p11559	Expression vector; <i>P_{spac}</i> , <i>Spc^R</i> in <i>E. coli</i> and in <i>D. radiodurans</i>	[19]
p12764	Source of HA-tag kanamycin cassette	[28]
p15801	p11520 with a PCR fragment encoding <i>pprA</i>	This work
p15802	p11559 with a PCR fragment encoding <i>pprA::HA</i>	This work

D. radiodurans strains were grown at 30 °C in TGY2X (1% tryptone, 0.2% dextrose, 0.6% yeast extract) or in TGYA (0.5% tryptone, 0.2% dextrose, 0.15% yeast extract) or plated on TGY1X containing 1.5% agar and *E. coli* strains were grown at 37 °C in Luria Broth. When necessary, media were supplemented with the appropriate antibiotics used at the following final concentrations: kanamycin, 6 μ g/mL; chloramphenicol, 3 μ g/mL; spectinomycin, 75 μ g/mL for *D. radiodurans* and 40 μ g/mL for *E. coli*.

2.2. DNA manipulations

Plasmid DNA was extracted from *E. coli* using the QIAprep spin miniprep kit (Qiagen). Chromosomal DNA of *D. radiodurans* was isolated from stationary phase cells in TGY2X medium. 2 mL cultures were harvested by centrifugation (9000 \times g at room temperature). Pellets were resuspended in 100 μ L of lysis buffer (triton 2%, SDS 1%, NaCl 0.1 M, EDTA 0.001 M) and disrupted with a fastprep desintegrator (Savant; Bio101) using 0.1 g of glass beads (500 μ m) in the presence of 100 μ L of phenol–chloroform for 120 s. 200 μ L of SSC 1X (NaCl 0.15 M; 0.015 Na₃citrate) was added. After centrifugation for 3 min at 9000 \times g, supernatants were treated with 1 volume of phenol–chloroform–isoamylalcohol (24:1, v/v). DNA was precipitated with ethanol and resuspended in 50 μ L of TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA) plus 4 μ L of RNase (5 mg/mL). Amplification of plasmid or genomic DNA by PCR was performed with Phusion DNA polymerase (Thermo Scientific) or Go Taq DNA polymerase (Promega).

2.3. Transformation of *D. radiodurans*

Exponentially growing bacteria were harvested by centrifugation, resuspended at 5×10^8 cells per mL in TGY2X medium supplemented with 30 mM CaCl₂ and 10% (v/v) glycerol, and stored at –80 °C. For transformation, aliquots (100 μ L) of competent cells were thawed on ice and mixed with an equal volume of TGY–CaCl₂ before DNA (100 ng of genomic DNA or 200 ng of plasmid DNA) was added. After 20 min at 0 °C and 60 min at 30 °C, 900 μ L of TGY2X was added and the cells were incubated for a further 5 h before plated on TGY plates containing the appropriate antibiotics.

2.4. Survival curve

Bacteria were grown in TGY2X supplemented with spectinomycin when bacteria contained a plasmid and with 1 mM IPTG for GY14625 strain ($\Delta pprA/p15802$: *P_{spac}::pprA::HA⁺*). Exponential phase cultures were concentrated to an $A_{650} = 20$ in TGY2X and irradiated on ice with a ¹³⁷Cs irradiation system (Institut Curie, Orsay, France) at a dose rate of 31 Gy/min. Following irradiation, diluted samples were plated on TGY plates. Colonies were counted after 3–4 days incubation at 30 °C.

2.5. Kinetics of DNA repair measured by pulse-field gel electrophoresis

Exponential cultures were concentrated to an $A_{650} = 20$ in TGY2X and irradiated on ice with a ¹³⁷Cs irradiation system (Institut Curie, Orsay, France) at a dose rate of 31 Gy/min to a total dose of 3800 Gy. Non-irradiated or irradiated cultures were diluted in TGY2X to an $A_{650} = 0.2$ and incubated at 30 °C. At different post-irradiation recovery times, culture aliquots (5 mL) were removed to prepare DNA plugs as described previously [12]. The embedded cells plugs were lysed, treated with *NotI* restriction enzyme and subjected to pulsed field gel electrophoresis as previously described [10].

2.6. Rate of DNA synthesis measured by DNA pulse labeling

The rate of DNA synthesis was measured according to modified protocol from Zahradka et al. [4]. Non-irradiated or irradiated cultures (3800 Gy) were diluted in TGYA to an $A_{650} = 0.2$ and incubated at 30 °C. At different times, 0.5 mL samples were taken and mixed with 0.1 mL pre-warmed TGYA containing 4.8 μCi [methyl- ^3H]thymidine (PerkinElmer, specific activity 70–90 Ci/mmol). Radioactive pulses of 15 min were terminated by addition of 2 mL ice-cold 10% TCA. Samples were kept on ice for at least 1 h, and then collected by vacuum filtration onto Whatman GF/C filters followed by washing twice with 5 mL 5% TCA and twice with 5 mL 96% ethanol. Filters were dried for 10 min under a heat source and placed in 4 mL scintillation liquid. The precipitated counts were measured in a liquid scintillation counter (Packard, TRI-carb 1600 TR).

2.7. Fluorescence microscopy

Non-irradiated or irradiated *D. radiodurans* cultures (3800 Gy) cells were diluted in TGY2X to an $A_{650\text{nm}} = 0.2$ and incubated at 30 °C. Aliquots (1 mL) were removed at different times and the cells were fixed using toluene at 3% final concentration. Cell membranes were stained with N-(3-triethylammonium-propyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)pyridinium dibromide (FM 4-64) at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the nucleoid with 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) at 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. FM 4-64 stains the lipid membranes with red fluorescence (excitation/emission 515/640 nm) and DAPI stains the nucleoid with blue fluorescence (excitation/emission 350/470 nm). The stained cells were observed using a Leica DM RXA microscope. Images were captured with a CDD camera 5 MHz Micromax 1300Y (Roper Instruments). The final reconstructed images were obtained by deconvoluting Z-series with Metamorph software (Universal Imaging).

2.8. Immunolocalization of HA-tagged PprA

Non-irradiated or irradiated cultures (3800 Gy) were diluted in TGY 2 \times to an $A_{650} = 0.2$ and incubated at 30 °C. Aliquots of 0.4 mL were taken at different post-irradiation times and the cells were fixed by addition of 1/10 volume of 37% paraformaldehyde in the culture medium and incubation overnight at 4 °C. After centrifugation (5 min, 12000 $\times g$), the cell pellets were subsequently washed once in 1 \times PBS. In order to permeabilize the cell envelope, the cells were treated with 4 mg/mL lysozyme for 30 min at 37 °C followed by incubation with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min at room temperature. Finally, the cells were washed in PBS and resuspended in 25 μL of PBS. A 3 μL aliquot was applied to a poly-L-lysine pre-treated slide spot, allowed to air dry and fixed by incubating in 4% PFA for 20 min at 37 °C. Cells were then blocked in 2% BSA in PBS-T (0.05% Tween 20 in PBS) and incubated for 2 h at 37 °C with a monoclonal mouse anti-HA antibody (Eurogentec) diluted 1/700 in blocking solution. After 20 min washing in PBS-T, the cells were incubated for 1 h at 37 °C with an FITC conjugated goat anti-mouse antibody (Jackson Immunoresearch Laboratories) diluted 1/250 in blocking solution and washed for 20 min in PBS-T. Cells were finally stained with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of DAPI for 10 min at room temperature. After a final wash in PBS-T, slides were mounted using fluoromount G as a mounting medium (Fluoroprobes). The stained colored cells were analyzed by fluorescence microscopy as described in Section 2.7.

2.9. Western blot analysis

20 mL of cultures removed at different times after irradiation were centrifuged. The pellets were resuspended in 150 μL of SSC1 \times

buffer and the cells were disrupted as described previously [20]. After centrifugation, 5 μg of the cell extracts were subjected to electrophoresis through a 12% SDS-PAGE and the proteins were transferred onto a PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane. The membrane was blocked with TBS containing 5% milk, 0.05% Tween 20 before being incubated overnight at 4 °C with a 1:5000 dilution of monoclonal mouse anti-HA antibodies (Eurogentec) in TBS containing 3% powdered milk, 0.05% Tween 20. After extensive washes in TBS-0.05% Tween 20, the membrane was incubated with anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate used as secondary antibody and revealed by a colorimetric reaction. Gels were analyzed by measuring intensity profiles for each lane using ImageLab software (Biorad).

3. Results and discussion

3.1. Efficient DNA double strand break repair in cells devoid of PprA protein

To investigate a possible implication of the PprA protein in DNA double strand break repair pathways, we examined whether $\Delta pprA$ mutant bacteria were affected (i) in the massive DNA synthesis that takes place during ESDSA and (ii) in the kinetics of reassembly of DNA fragments. We used a deletion-substitution mutant $\Delta pprA\Omega cat$ in which the coding region of *pprA* was substituted with a *cat* cassette. The mutant displayed an increased sensitivity to γ -rays consistent with previous reports [9,11] (Fig. 1). Furthermore, we verified that this phenotype was due to the absence of the PprA protein by showing that, when PprA was expressed *in trans* under the control of its native promoter from the gene cloned into plasmid p11520, the $\Delta pprA$ mutant recovered a wild type radioresistance phenotype (Fig. 1A). *De novo* DNA synthesis was measured by labeling DNA with a 15 min ^3H -thymidine pulse at different post-irradiation times and double strand break repair was analyzed by pulsed-field gel electrophoresis by monitoring the appearance of the complete pattern of 11 resolvable genomic DNA fragments generated by *NotI* digestion. The cells were exposed to 3800 Gy γ -irradiation, a dose that introduces approximately 100 DNA double strand break per genome equivalent in a *D. radiodurans* cell [21]. This dose did not affect the survival of the wild type strain whereas only 5% of the $\Delta pprA$ mutant survived (Fig. 1B). We observed a massive incorporation of ^3H -thymidine in the $\Delta pprA$ mutant, which starts about 90 min after irradiation

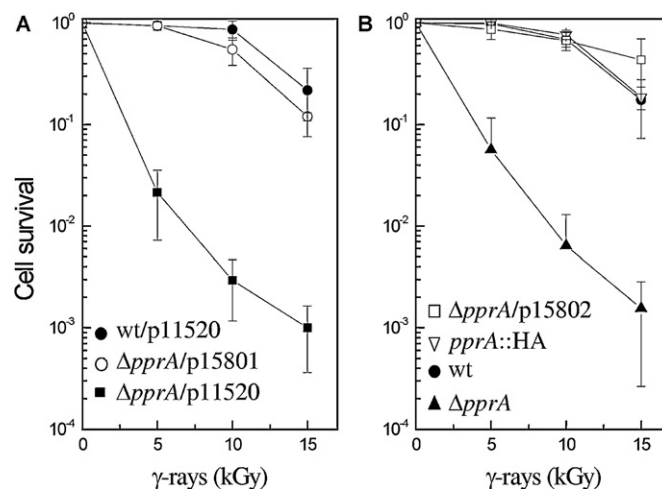


Fig. 1. Cell survival. (A) Wild-type/p11520 (closed circles), $\Delta pprA/p15801$: *pprA*⁺ (open circles), $\Delta pprA/p11520$ (closed squares). (B) Wild-type (closed circles), $\Delta pprA$ (closed triangles), $\Delta pprA/p15802$: *pprA*::HA⁺ (open squares), *pprA*::HA (open inverted triangles).

with a rate of DNA synthesis similar to that of the parental wild-type strain (Fig. 2A). However, DNA synthesis slows down after 120 min in the mutant strain, whereas it proceeds in the wild type strain until 180 min (Fig. 2A). The kinetics of reassembly of DNA fragments are shown in Fig. 2B. Genome reconstitution took place efficiently in the mutant although with a delay of about 1 h as compared to the wild type (Fig. 2B), suggesting an early role of PprA in DNA repair. Consistent with this hypothesis, PprA was rapidly induced after irradiation and its concentration was maximal 1 h after irradiation (Fig. S1), before the beginning of fragments reassembly.

3.2. PprA does not play a major role in a RecA-independent pathway

It has been shown that purified PprA protein stimulates *in vitro* end-joining reactions catalyzed by ATP- and NAD-dependent ligases while inhibiting *E. coli* exonuclease III activity [9]. Based on these biochemical activities, it has been proposed that PprA may act as a Ku-like protein and stimulate an NHEJ repair pathway [9]. On the other hand, a slow and incomplete assembly of radiation-induced DNA fragments has been previously shown to take place in $\Delta recA$ bacteria [4,6,22]. To analyze a possible role of PprA in a *recA*-independent repair pathway, we examined the kinetics of fragment assembly in a $\Delta recA\Delta pprA$ double mutant. The $\Delta recA\Delta pprA$ mutant used was as radiosensitive as the $\Delta recA$ single mutant (Fig. S2) confirming previous results by Tanaka et al. [11]. Moreover, the two mutants showed no difference in the slow kinetics of reassembly of DNA fragments (Fig. 2C). In both strains, a partial reconstitution of the genome was observed only 26 h after irradiation. These results are in contrast with those obtained with DdrB, another DNA damage-induced protein. It was shown that, in this case, the absence of DdrB increases the radiosensitivity of $\Delta recA$ bacteria and completely abolishes fragment reassembly in $\Delta recA$ bacteria [15]. *In vitro*, DdrB protein stimulates single strand annealing and *in vivo* appears to work in an SSA DNA double strand break repair pathway [8,15] consistent with an involvement of DdrB in a RecA-independent repair pathway.

In the case of PprA, we conclude that it does not play a major role in the reassembly of DNA fragments through RecA-independent NHEJ or SSA pathways. The severe radiosensitive phenotype of cells devoid of PprA might result from the involvement of PprA either in an essential final step of genome reconstitution taking place after the majority of DNA lesions have been repaired, and/or in a regulatory pathway linking the completion of DNA repair to the restart of DNA replication and cell division.

3.3. PprA localizes as a thread across the septum

To better understand the role of PprA protein in irradiated cells, we analyzed the cell localization of the PprA protein by immunofluorescence microscopy. For this purpose, the PprA protein was tagged at its C-terminal end with the HA epitope and expressed in replacement of the native protein. Because *D. radiodurans* contains from 4 to 10 genome equivalents, the transformants were purified two fold on selective media in order to obtain the mutant homogenotes whose purity was verified by PCR (Fig. 3). Bacteria expressing the PprA-HA protein by allelic replacement of the wild type *pprA* gene or by expression *in trans* from plasmid p15802 in the $\Delta pprA$ mutant were as radioresistant as the wild type bacteria (Fig. 1B), demonstrating the functionality of the fusion protein. The PprA-HA protein expressed under the control of the wild type *pprA* promoter was not detected in non-irradiated cells by immunofluorescence microscopy (Fig. 4) or by western blot analysis (Fig. S1) under our conditions.

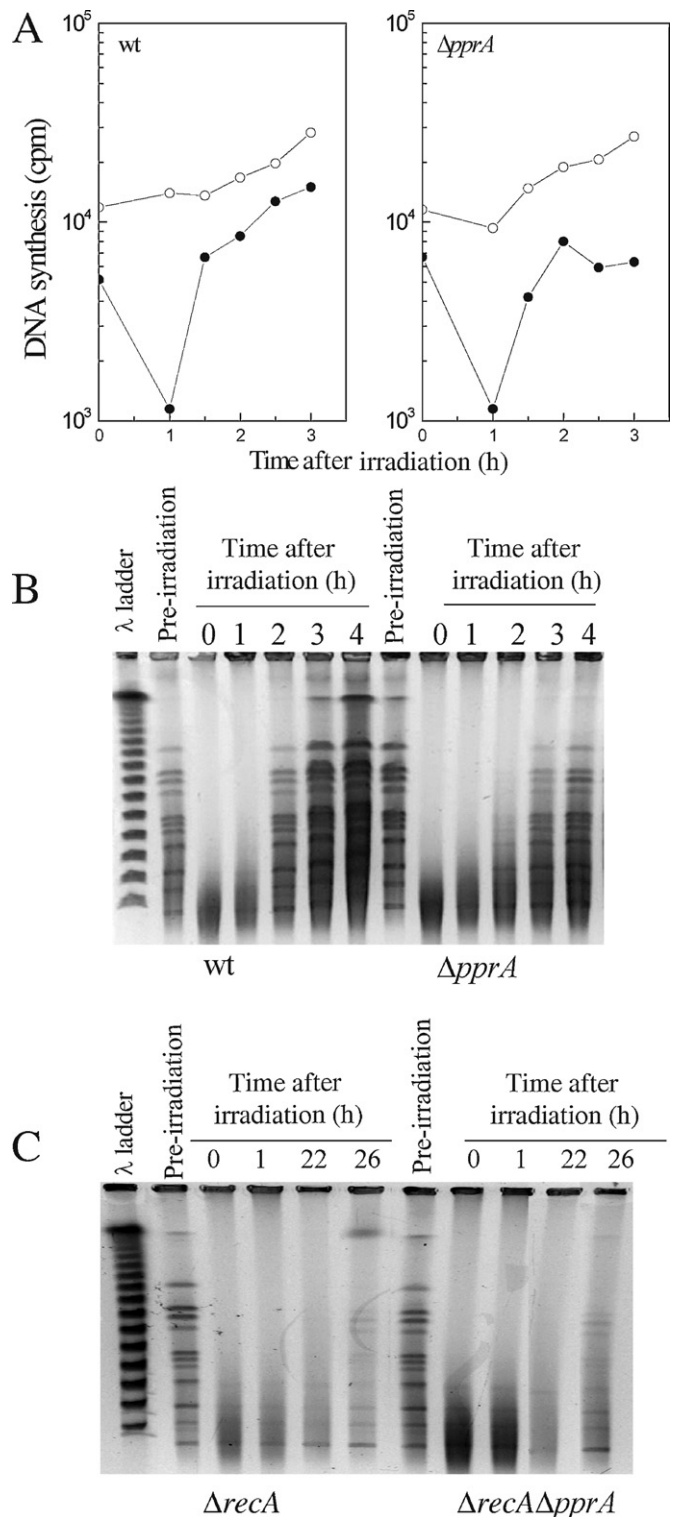


Fig. 2. DNA synthesis and kinetics of DNA double strand break repair in $\Delta pprA$ and $\Delta recA\Delta pprA$ mutants. (A) Rate of DNA synthesis in wild type and $\Delta pprA$ mutant. Incorporation of [³H] thymidine during 15 min pulse labeling measures the global rate of DNA synthesis in 3800 Gy irradiated (filled circles) and unirradiated (open circles) bacteria. (B) Kinetics of double strand break repair in wild type and $\Delta pprA$ mutant followed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). PFGE shows *NotI* treated DNA from unirradiated cells (lane pre-irradiation) and from irradiated cells (3800 Gy) immediately after irradiation (0) and at the indicated incubation times (h). (C) Kinetics of double strand break repair in $\Delta recA$ and $\Delta recA\Delta pprA$ mutants. Experiments were performed as described in B. The data shown are from a single experiment, and matched those obtained in two other independent assays.

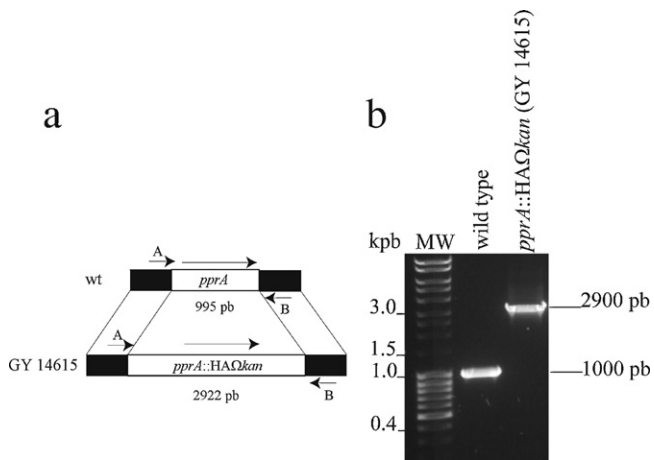


Fig. 3. Schematic representation and test of the homozygosity of the *pprA::HAΩkan* strain (GY14615). (a) Schematic representation of the allele replacement event in the *pprA* gene. Short arrows indicate the position of primer pairs used for diagnostic PCR. (b) Analysis of the *pprA::HAΩkan* strain (GY14615). Expected sizes of the wild type and the GY14615 PCR fragments are given on the right and the size markers (MW) on the left.

One hour after irradiation, 84% (384/459) of labeled cells contained fluorescence signal as foci at the center of the nucleoid whereas in 16% of labeled cells, fluorescence appeared as a thread across the septum (Fig. 4). Two hours after irradiation, the number of cells containing fluorescent PprA-HA across the septum increased to 37% of the population. Then, 3 h after γ -irradiation, the intensity of fluorescence decreased and PprA-HA appeared as a fine thread between the daughter cells.

These results show that, after irradiation, the PprA protein is recruited early onto the nucleoid, before DNA repair completion, and then is found associated with DNA at the septum in dividing cells suggesting a role of PprA in chromosome segregation and/or cell division.

When the PprA::HA protein was expressed from the plasmid p15802 under the P_{spac} promoter in the presence of 1 mM of IPTG, the PprA::HA protein was detected by immunofluorescence microscopy on the nucleoid before irradiation, suggesting that PprA::HA binds DNA even in the absence of DNA lesions (data not shown).

3.4. PprA is required for completion of DNA segregation between daughter cells after γ -irradiation

To know whether the absence of PprA protein lead to defects in DNA segregation and/or cell division, we examined by epifluorescence and deconvolution microscopy the cell morphology of wild type and $\Delta pprA$ bacteria at different times after irradiation. In the absence of irradiation, both $\Delta pprA$ and wild-type cells presented the same morphology (Fig. 5). After irradiation, abnormal cells were observed in the $\Delta pprA$ mutant (Table 2). The percentage of these abnormal cells increased from less than 0.5% 1 h after irradiation to 8.6%, 57.8% and more than 90%, 2 h, 4 h and 7 h after irradiation, respectively (Table 2; Fig. 5). The phenotypes observed were defects in segregation of DNA between daughter cells, the presence of anucleate cells, guillotined DNA and enlarged cells. As shown in Fig. 5, after 4 h post-irradiation incubation, DNA was equally present in the two daughter cells but was not separated at the division septum in about 30% of the population. When the native PprA protein was expressed *in trans* under the control of its own promoter, the

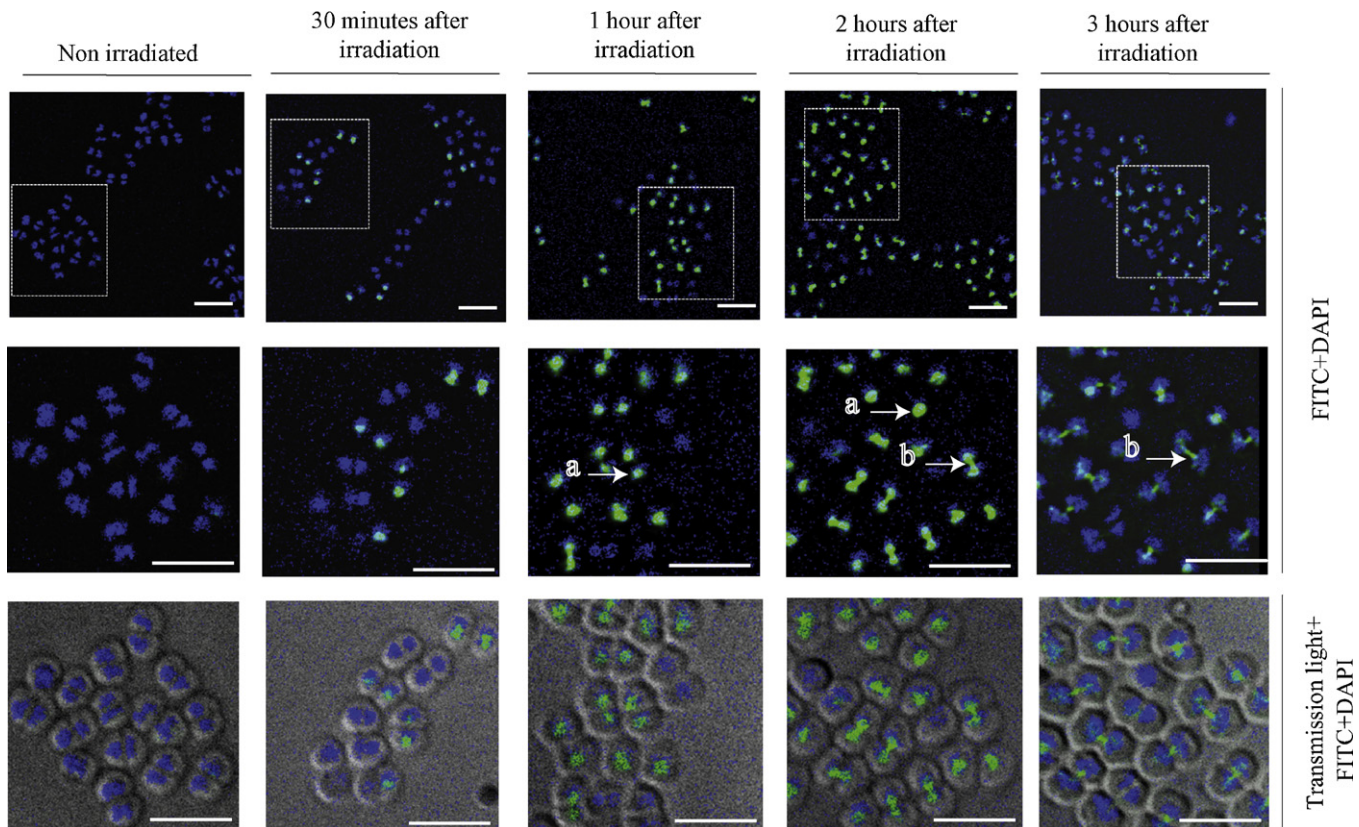


Fig. 4. Immunolocalization of the PprA-HA protein in *D. radiodurans* after γ -irradiation. GY14615 cells (*pprA::HA::kan*) exposed to 3800 Gy γ -irradiation were incubated for the indicated time periods with anti-HA primary antibody followed by an FITC secondary antibody (green) and with DAPI (blue). Overlays of the FITC and DAPI images as well as overlays of transmission light, FITC and DAPI are shown. (a) foci located the nucleoid, (b) PprA-HA across the septum. Bars, 5 μ m.

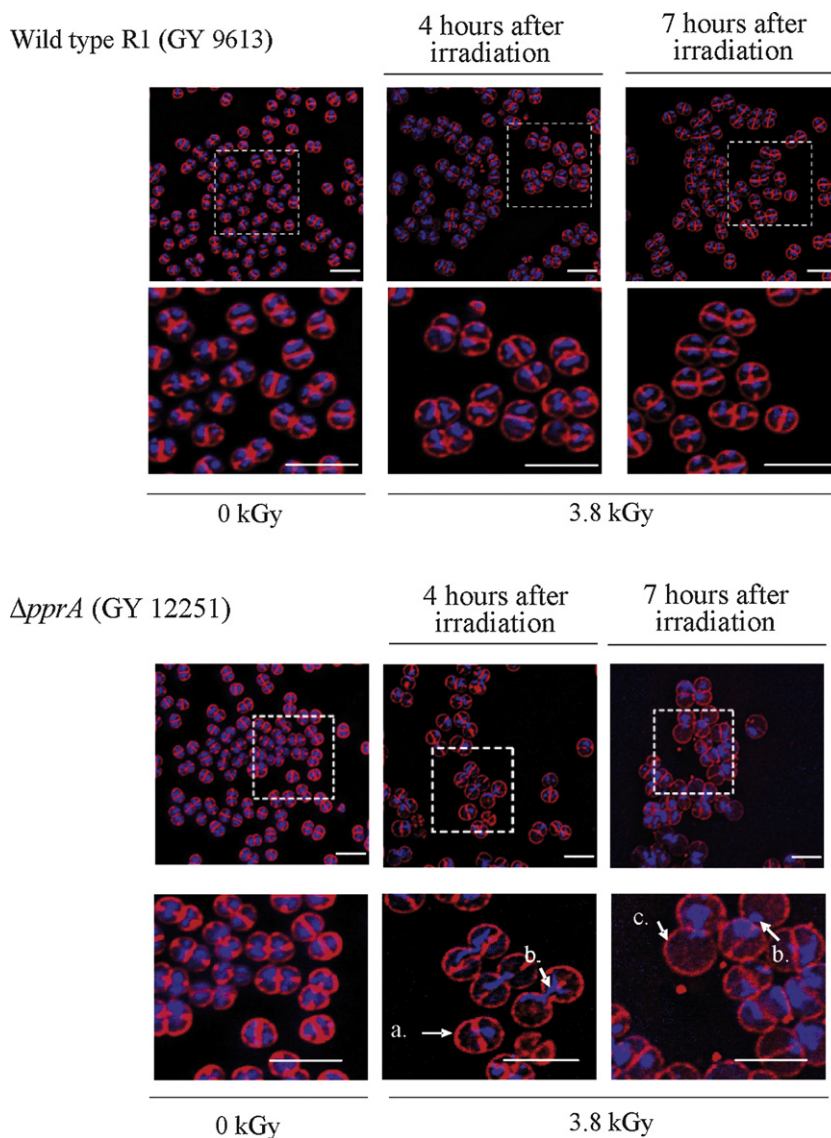


Fig. 5. Illustration of abnormal $\Delta pprA$ cells observed by fluorescence microscopy during recovery after exposure to 3800 Gy γ -irradiation. (A) Wild-type cells 4 h and 7 h after post-irradiation incubation. (B) $\Delta pprA$ cells 4 h and 7 h after post-irradiation incubation. (a) anucleated cells, (b) cells with abnormal segregation of chromosomes, (c) large cells. Bars, 5 μ m.

$\Delta pprA/pprA^+$ cells have the same morphology as wild type cells (Fig. S3).

To test if the observed cell abnormalities were due to the absence of the PprA protein or were just the consequence of cell death, we investigated cell morphologies during post-irradiation incubation of bacteria deficient for other DNA repair genes such as $\Delta ddrA$ or $\Delta ddrB$ mutants. $\Delta ddrA$ and $\Delta ddrB$ cells were exposed to 15,000 and 10,000 Gy, respectively, resulting in a survival of 6% comparable to those of $\Delta pprA$ bacteria exposed to 3,800 Gy γ -irradiation for both mutant strains. As shown in Fig. 6, all types of abnormalities were observed after 4 h post-irradiation incubation of $\Delta ddrA$ and $\Delta ddrB$ mutant bacteria except DNA strangled at the closing septum observed under the same conditions only in the $\Delta pprA$ mutant bacteria.

These results suggest that the PprA protein is required for efficient segregation of DNA between daughter cells and for completion of cell division after exposure to ionizing radiation. However, unirradiated cells devoid of PprA did not present any growth defect (data not shown) or abnormal morphologies (Fig. 5),

suggesting that PprA acts preferentially after treatment of cells by DNA damaging agents.

Chromosome segregation is a multistep process involving active segregation of the newly synthesized origin regions, condensation-driven partitioning of the bulk of the chromosomes followed by the separation of the terminus regions (for review, see [23–25]). Our results are in favor of an involvement of PprA in the late step, perhaps in the process of DNA decatenation or dimer resolution, to ensure the complete separation of sister chromosomes between daughter cells. However, taking into account the Ku-like biochemical activity of PprA, we cannot exclude that PprA functions as a quality control of DNA integrity by sensing the presence of DNA breaks or gaps to prevent segregation of damaged DNA between daughter cells. This hypothesis is supported by the involvement of eukaryotic NHEJ factors in the replication stress response (for reviews, see [26]).

In conclusion, PprA might play crucial role(s) after DNA damage at the interface of DNA repair, chromosome segregation and cell division. However, an understanding of the precise mode of action

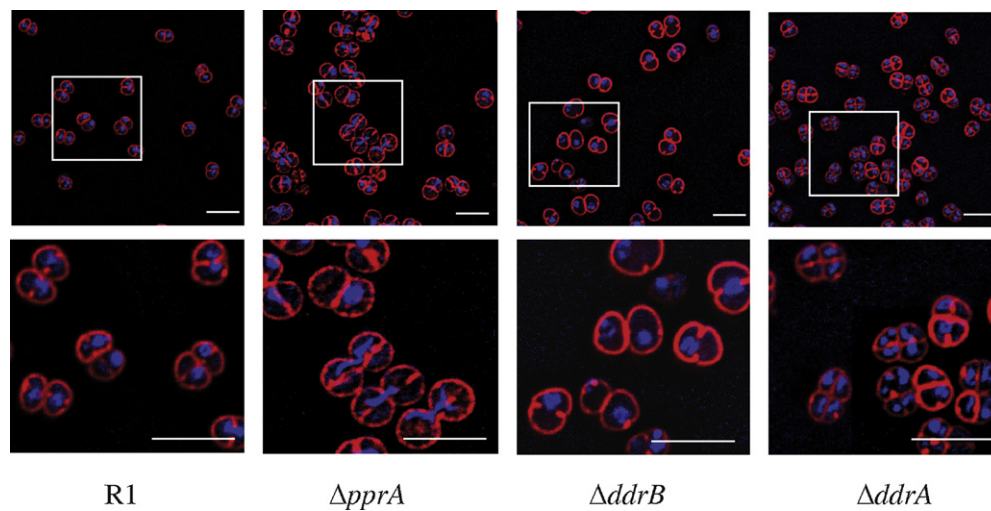


Fig. 6. Cell morphology of wild-type and mutant strains after 4 h post-irradiation. The cells were irradiated at a dose chosen to obtain comparable cell survivals. R1: 15000 Gy (20% cell survival), $\Delta pprA$: 3800 Gy (5% cell survival), $\Delta ddrB$: 10000 Gy (6% cell survival), $\Delta ddrA$: 15000 Gy (6% cell survival).

Table 2

Percentage of abnormal cells in $\Delta pprA$ mutant during recovery from γ -irradiation. GY12251 ($\Delta pprA$) and wild type cells were exposed or not to 3800 Gy γ -irradiation. Irradiated culture were diluted in TGY2X and incubated for the indicated times. Cells were processed for staining as indicated in Section 2.

	Total number of cells examined	% of abnormal cells
Unirradiated control		
Wild-type R1	794	<0.5
$\Delta pprA$	556	<0.5
0 h post-irradiation incubation		
Wild-type R1	385	<0.5
$\Delta pprA$	396	<0.5
1 h post-irradiation incubation		
Wild-type R1	200	<0.5
$\Delta pprA$	195	<0.5
2 h post-irradiation incubation		
Wild-type R1	145	<0.5
$\Delta pprA$	324	8.6
3 h post-irradiation incubation		
Wild-type R1	264	<0.5
$\Delta pprA$	330	57.8
4 h post-irradiation incubation		
Wild-type R1	508	<0.5
$\Delta pprA$	193	75.6
5 h post-irradiation incubation		
Wild-type R1	277	<0.5
$\Delta pprA$	233	90.9
6 h post-irradiation incubation		
Wild-type R1	245	<0.5
$\Delta pprA$	132	92.4
7 h post-irradiation incubation		
Wild-type R1	754	<0.5
$\Delta pprA$	124	92.5

of PprA in chromosome segregation after γ -irradiation awaits further studies.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

We thank Adriana Bailone for critical reading of the manuscript, Michael DuBow for polishing our English, the Institut Curie for the use of the ^{137}Cs irradiation system. This work was carried out in compliance with the current laws governing genetic experimentation in France. This work was supported by the Centre National

de la Recherche Scientifique, the University Paris-Sud 11, the Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA ILC42V), Electricité de France (RB2007-11), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-BSV3-017-01).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.01.004>.

References

- [1] M.M. Cox, J.R. Battista, *Deinococcus radiodurans* – the consummate survivor, *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (2005) 882–892.
- [2] M. Blasius, U. Hubscher, S. Sommer, *Deinococcus radiodurans*: what belongs to the survival kit? *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 43 (2008) 221–238.
- [3] D. Slade, M. Radman, Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75 (2011) 133–191.
- [4] K. Zahradka, D. Slade, A. Bailone, S. Sommer, D. Averbeck, M. Petranovic, A.B. Lindner, M. Radman, Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*, *Nature* 443 (2006) 569–573.
- [5] D. Slade, A.B. Lindner, G. Paul, M. Radman, Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans*, *Cell* 136 (2009) 1044–1055.
- [6] M.J. Daly, K.W. Minton, An alternative pathway of recombination of chromosomal fragments precedes *recA*-dependent recombination in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 4461–4471.
- [7] J. Repar, S. Cvjetan, D. Slade, M. Radman, D. Zahradka, K. Zahradka, RecA protein assures fidelity of DNA repair and genome stability in *Deinococcus radiodurans*, *DNA Repair (Amst)* 9 (2010) 1151–1161.
- [8] C. Bouthier de la Tour, S. Boissnard, C. Norais, M. Touelle, E. Bentchikou, F. Vannier, M.M. Cox, S. Sommer, P. Servant, 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 (2011) 1223–1231.
- [9] I. Narumi, K. Satoh, S. Cui, T. Funayama, S. Kitayama, H. Watanabe, PprA: a novel protein from *Deinococcus radiodurans* that stimulates DNA ligation, *Mol. Microbiol.* 54 (2004) 278–285.
- [10] F. Lecoince, I.V. Shevelev, A. Bailone, S. Sommer, U. Hubscher, Involvement of an X family DNA polymerase in double-stranded break repair in the radioresistant organism *Deinococcus radiodurans*, *Mol. Microbiol.* 53 (2004) 1721–1730.
- [11] M. Tanaka, A.M. Earl, H.A. Howell, M.J. Park, J.A. Eisen, S.N. Peterson, J.R. Battista, Analysis of *Deinococcus radiodurans*'s transcriptional response to ionizing radiation and desiccation reveals novel proteins that contribute to extreme radioresistance, *Genetics* 168 (2004) 21–33.
- [12] D.R. Harris, M. Tanaka, S.V. Saveliev, E. Jolivet, A.M. Earl, M.M. Cox, J.R. Battista, Preserving genome integrity: the DdrA protein of *Deinococcus radiodurans* R1, *PLoS Biol.* 2 (2004) e304.
- [13] E. Jolivet, F. Lecoince, G. Coste, K. Satoh, I. Narumi, A. Bailone, S. Sommer, Limited concentration of RecA delays DNA double-strand break repair in *Deinococcus radiodurans* R1, *Mol. Microbiol.* 59 (2006) 338–349.

- [14] C.A. Norais, S. Chitteni-Pattu, E.A. Wood, R.B. Inman, M.M. Cox, DdrB protein, an alternative *Deinococcus radiodurans* SSB induced by ionizing radiation, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 21402–21411.
- [15] G. Xu, H. Lu, L. Wang, H. Chen, Z. Xu, Y. Hu, B. Tian, Y. Hua, DdrB stimulates single-stranded DNA annealing and facilitates RecA-independent DNA repair in *Deinococcus radiodurans*, *DNA Repair (Amst)* 9 (2010) 805–812.
- [16] S. Kitayama, S. Asaka, K. Totsuka, DNA double-strand breakage and removal of cross-links in *Deinococcus radiodurans*, *J. Bacteriol.* 155 (1983) 1200–1207.
- [17] Y. Kobayashi, I. Narumi, K. Satoh, T. Funayama, M. Kikuchi, S. Kitayama, H. Watanabe, Radiation response mechanisms of the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*, *Biol. Sci. Space* 18 (2004) 134–135.
- [18] R. Meima, H.M. Rothfuss, L. Gewin, M.E. Lidstrom, Promoter cloning in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 3169–3175.
- [19] S. Mennequier, G. Coste, P. Servant, A. Bailone, S. Sommer, Mismatch repair ensures fidelity of replication and recombination in the radioresistant organism *Deinococcus radiodurans*, *Mol. Genet. Genomics* 272 (2004) 460–469.
- [20] C. Bouthier de la Tour, M. Toueille, E. Jolivet, H.H. Nguyen, P. Servant, F. Vannier, S. Sommer, The *Deinococcus radiodurans* SMC protein is dispensable for cell viability yet plays a role in DNA folding, *Extremophiles* 13 (2009) 827–837.
- [21] J.R. Battista, Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*, *Annu. Rev. Microbiol.* 51 (1997) 203–224.
- [22] E. Bentchikou, P. Servant, G. Coste, S. Sommer, A major role of the RecFOR pathway in DNA double-strand-break repair through ESDSA in *Deinococcus radiodurans*, *PLoS Genet.* 6 (2010) e1000774.
- [23] M. Thanbichler, Synchronization of chromosome dynamics and cell division in bacteria, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2 (2010) a000331.
- [24] C. Possoz, I. Junier, O. Espeli, Bacterial chromosome segregation, *Front. Biosci.* 17 (2012) 1020–1034.
- [25] E. Toro, L. Shapiro, Bacterial chromosome organization and segregation, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2 (2010) a000349.
- [26] C. Allen, A.K. Ashley, R. Hromas, J.A. Nickoloff, More forks on the road to replication stress recovery, *J. Mol. Cell Biol.* 3 (2011) 4–12.
- [27] P. Servant, E. Jolivet, E. Bentchikou, S. Mennequier, A. Bailone, S. Sommer, The ClpPX protease is required for radioresistance and regulates cell division after gamma-irradiation in *Deinococcus radiodurans*, *Mol. Microbiol.* 66 (2007) 1231–1239.
- [28] M. Toueille, 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, A comparative proteomic approach to better define *Deinococcus* nucleoid specificities, *J. Proteomics* 75 (2012) 2588–2600.

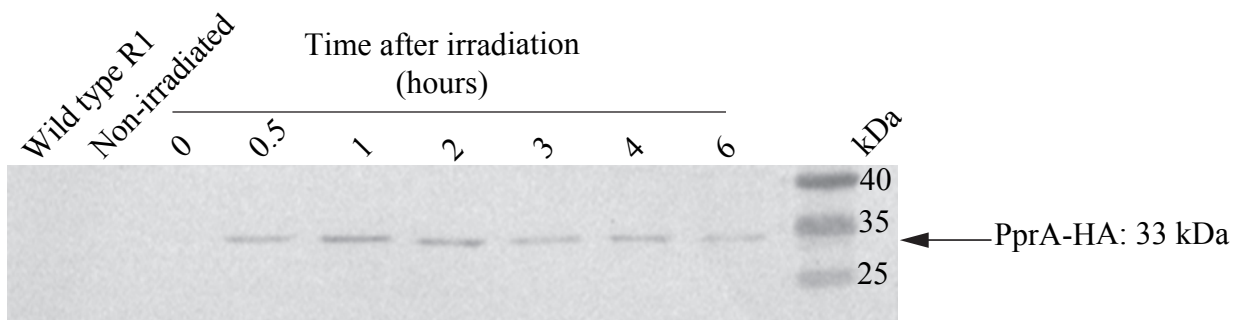


Fig. S1. Expression of PprA-HA in *D. radiodurans*. *D. radiodurans* GY14615 (*pprA::HA Ω kan*) cell extracts from unirradiated (pre-irradiation) or irradiated cells exposed to 3,800 Gy γ -irradiation and incubated during the indicated periods (min) were subjected to 12% SDS-PAGE and analyzed by western blot with anti-HA antibodies. 5 μ g of protein were loaded on each well. A cell extract from R1 was used as a negative control.

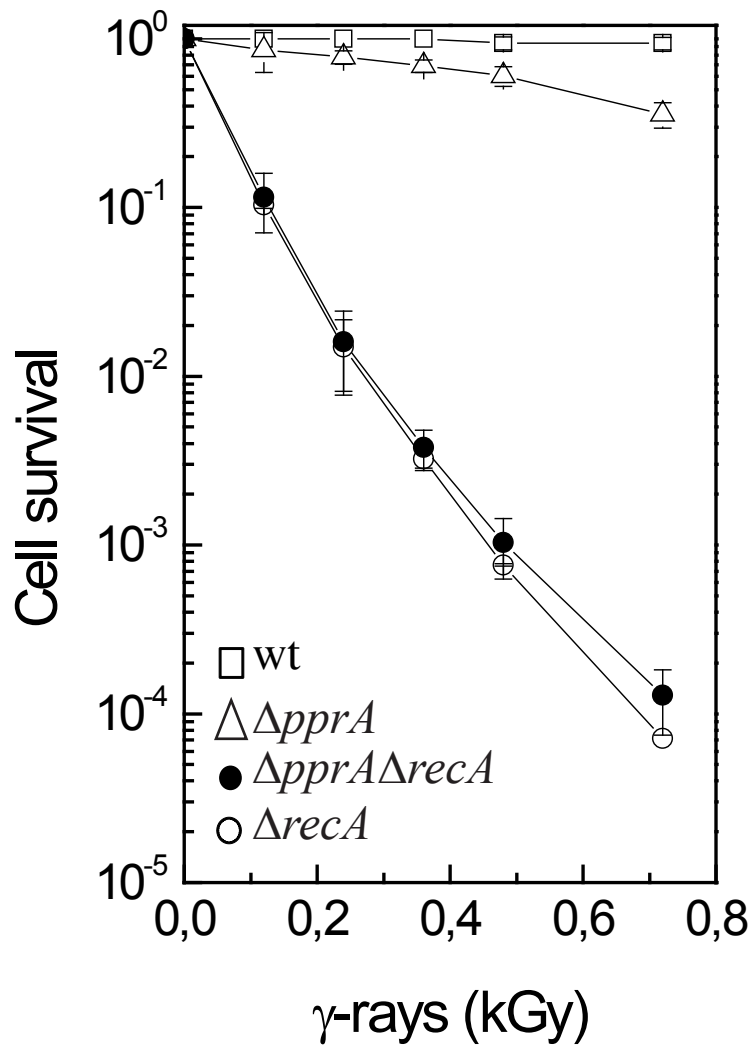


Fig S2 : Cell survival. Wild-type (open squares), $\Delta pprA$ (open triangles), $\Delta recA$ (open circles), $\Delta recA\Delta pprA$ (closed circles).

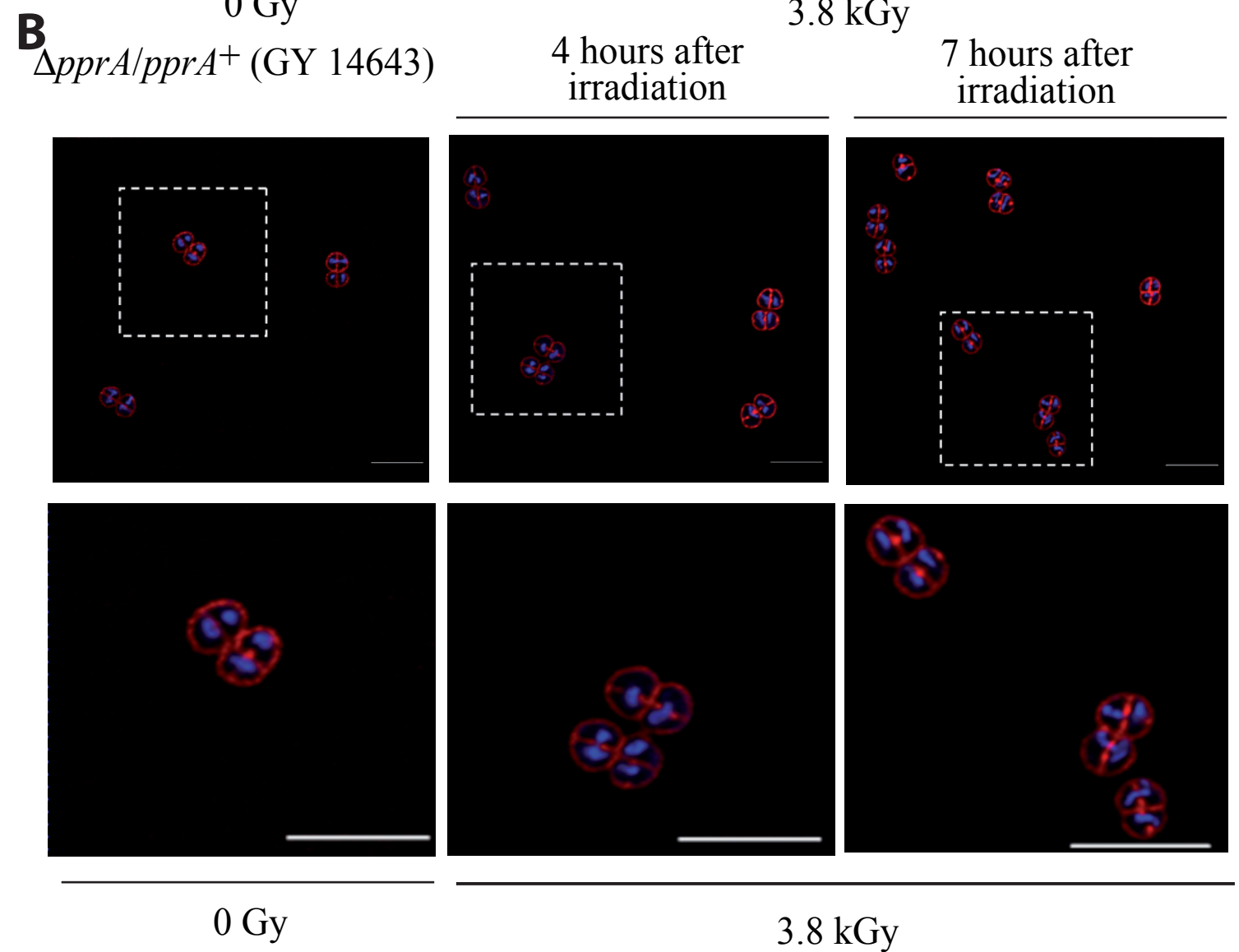
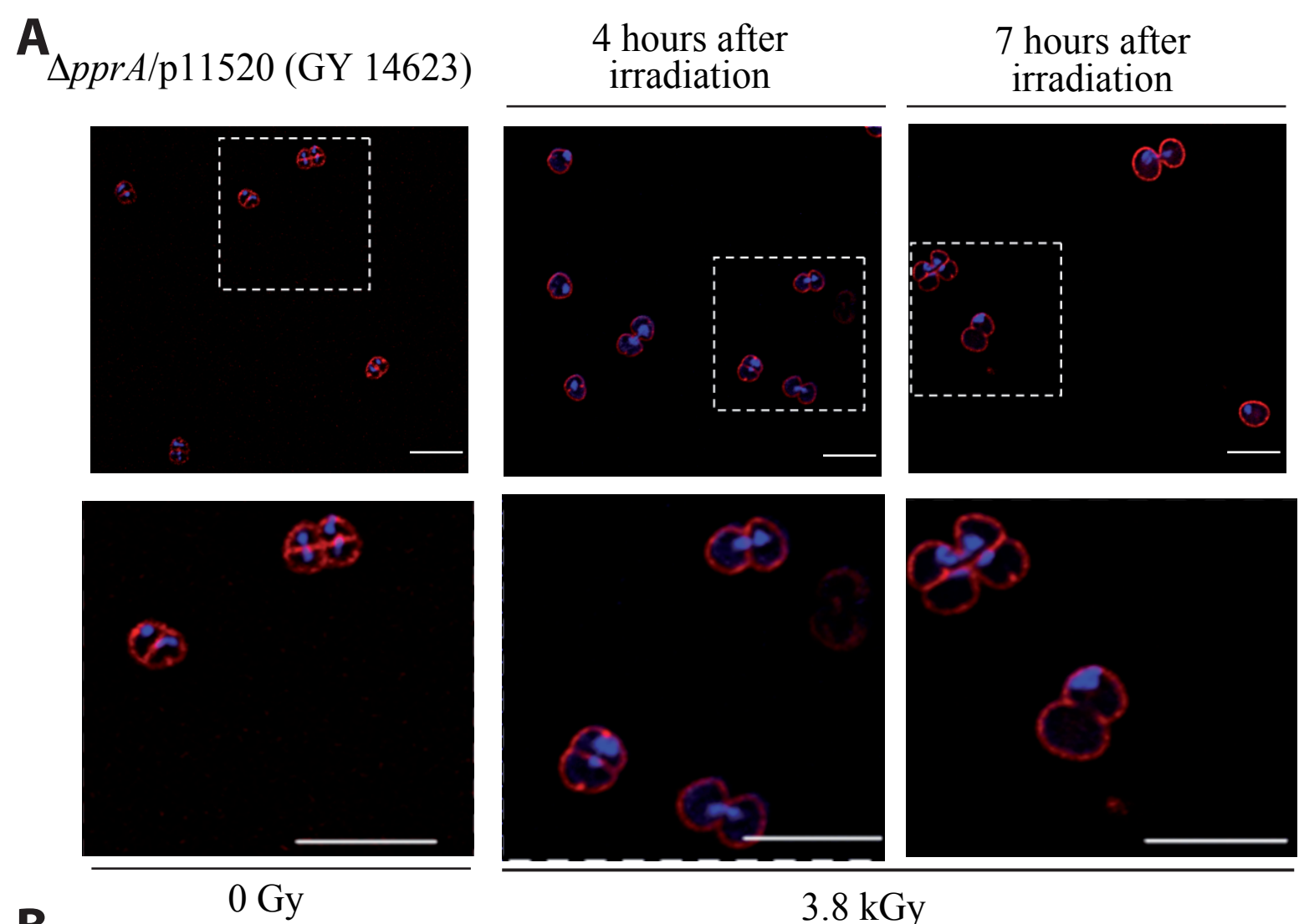


Fig S3 : Cell morphology of $\Delta pprA/p11520$ (GY 14623) and $\Delta pprA/pprA^+$ (GY 14643) strains during recovery after exposure to 3,800 Gy γ -irradiation. (A) $\Delta pprA/p11520$ (GY 14623) cells 4 h and 7 h after post-irradiation incubation. (B) $\Delta pprA/pprA^+$ (GY 14643) cells 4 h and 7 h after post-irradiation incubation. Bars, 5 μ m.

Chapitre 2 :

La protéine PprA est impliquée dans la ségrégation des chromosomes par interaction physique et fonctionnelle avec l'ADN gyrase chez la bactérie *Deinococcus radiodurans* après irradiation

Présentation de la problématique

Au début de ma thèse, assez peu de chose étaient connues en ce qui concernait l'interaction de PprA avec d'autres protéines ou autres composants cellulaires. En 2010, PprA a été identifiée dans un complexe protéique impliqué dans la maturation des extrémités d'ADN et dans la synthèse d'ADN en association avec l'ADN ligase LigB, une protéine kinase (Kota & Misra, 2008, Kota *et al.*, 2010) et une des ADN topoisomérase de *D. radiodurans* : topoIB.

Un des aspects de ma thèse a consisté à identifier le réseau d'interactants *in vivo* de PprA après irradiation. Pour cela j'ai mis au point une technique d'immunoprécipitation permettant d'utiliser la protéine de fusion PprA-HA comme appât afin d'identifier ses partenaires associés après irradiation. L'analyse et l'identification de ces protéines associées ont pu être réalisées grâce à la collaboration mise en place avec Jean Armengaud. Un des interactants identifiés est l'ADN gyrase, nous avons donc focalisé notre étude sur l'interaction PprA/ADN gyrase.

En parallèle de notre travail, l'équipe indienne ayant réalisés les expériences de purification des complexes protéiques en 2010 a également entrepris d'investiguer sur les protéines interactantes de PprA. Leurs expériences menées *in vitro* ont mis en évidence une interaction entre PprA et la sous unité de l'ADN gyrase GyrA (Kota *et al.*, 2014a) ainsi qu'avec la topoisomérase IB ((Kota *et al.*, 2014b). Ils ont montré que PprA augmentait l'activité de relaxation de TopoIB sur de l'ADN surenroulé. Ils ont également montré que le mutant $\Delta pprA$ était très sensible à un inhibiteur de l'ADN gyrase, l'acide nalidixique (Kota *et al.*, 2014b).

Nos résultats sont présentés dans ce chapitre et sont actuellement soumis pour publication à Nucleic Acid research.

Article 2

PprA protein is involved in chromosome segregation via its physical and functional interaction with DNA gyrase in irradiated *Deinococcus radiodurans* bacteria

PprA protein is involved in chromosome segregation via its physical and functional interaction with DNA gyrase in irradiated *Deinococcus radiodurans* bacteria

Alice Devigne¹, Claire Bouthier de la Tour¹, Philippe Guérin², Johnny Lisboa^{1,3}, Sophie Quevillon-Cheruel¹, Jean Armengaud², Suzanne Sommer¹ and Pascale Servant^{1,*,#}.

¹ Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris Sud, 91405 Orsay, France

² CEA, DSV, IBiTec-S, SPI, Li2D, Laboratory "Innovative Technologies for Detection and Diagnostics", Bagnols-sur-Cèze, F-30200, France

³ Present address: Institute for Molecular and Cell Biology (IBMC), R. Campo Alegre 823, 4150-180 Porto, Portugal

To whom correspondence should be addressed. Tel: 33(1) 69 15 57 18, Fax: 33(1) 69 15 78

18, Email: pascale.servant@igmors.u-psud.fr

Key words: *Deinococcus radiodurans*, PprA, DNA gyrase, DNA decatenation

ABSTRACT

PprA, a radiation-induced *Deinococcus* specific protein, was previously shown to be required for cell survival and accurate chromosome segregation after exposure to ionizing radiation. Here, we used an *in vivo* approach to determine, by shotgun proteomics, putative PprA partners co-immuno precipitating with PprA when cells were exposed to γ -rays. Among them, we found the two subunits of DNA gyrase and thus chose to focus our work on the characterization of the activities of the deinococcal DNA gyrase in the presence or absence of PprA. Loss of PprA rendered cells hypersensitive to novobiocin, an inhibitor of the B subunit of DNA gyrase. We showed that treatment of bacteria with novobiocin resulted in induction of the RDR regulon, and in defects in chromosome segregation aggravated in the absence of PprA. *In vitro*, the deinococcal DNA gyrase, as other bacterial DNA gyrases, possesses DNA negative supercoiling and decatenation activities. These two activities are inhibited *in vitro* by novobiocin and nalidixic acid, whereas PprA specifically stimulates the decatenation activity of DNA gyrase. Together, these results suggest that PprA plays a major role in chromosome decatenation via its interaction with the deinococcal DNA gyrase when *D. radiodurans* cells recovered from exposure to ionizing radiation.

INTRODUCTION

The bacterium *Deinococcus radiodurans* possesses an exceptional resistance to the lethal effects of DNA damaging agents and is able to reconstruct a functional genome from a myriad of radiation-induced chromosomal fragments. This radioresistance is likely the result of a combination of different mechanisms including protection of proteins against oxidation, efficient DNA double strand break repair and a compact nucleoid structure [for review see (1-3)]. Different DNA repair pathways have been proposed to be involved in the reconstitution of an intact genome in *D. radiodurans*: extended synthesis-dependent strand annealing (ESDSA) (4), homologous recombination (HR) (5-7), single strand annealing (SSA) (8-10) and non-homologous end joining (11,12).

Narumi *et al* characterized a *pprA* (DRA_0346) mutant that exhibited a high sensitivity to γ -radiation and DNA-damaging agents (11). The *pprA* gene is a *Deinococcus* specific gene belonging to a radiation-desiccation response (RDR) regulon comprising genes that are highly induced after DNA damage and contain a conserved motif (RDRM) upstream of their coding region (13). Recently, it was shown that DdrO acts as a repressor of the RDR regulon and that IrrE, a metalloprotease, cleaves DdrO after irradiation leading to transcriptional induction of various genes belonging to the RDR regulon (14-16). *In vitro*, PprA preferentially binds double-stranded DNA carrying strand breaks, inhibits *Escherichia coli* exonuclease III activity and stimulates the DNA end-joining reaction catalyzed by ATP-dependent DNA ligases (11). It has also been shown that PprA polymerizes along supercoiled, nicked, circular or linear double stranded DNA (17). After irradiation, PprA is a part of a multiprotein complex containing 24 proteins including DNA ligases, DNA topoisomerase IB, SSB and the DNA polymerase I, and exhibiting both DNA synthesis and DNA end-processing functions (18). We recently reported that repair of DNA DSB in cells devoid of PprA and exposed to γ -radiation takes place efficiently with a delay of approximately 1 hour as compared to the wild type (19). All these results suggest that PprA might function as a pleiotropic protein involved in the repair of DNA double strand breaks (DSB) and other radiation-induced damages (11). After irradiation, the PprA protein is recruited early onto the nucleoid and localizes later through the septum of dividing cells when DNA repair is completed (19). Untreated cells devoid of PprA display a wild type morphology but, after γ -irradiation, the absence of PprA leads to severe defects in DNA segregation and cell division (19).

In bacteria, topoisomerases play a major role in chromosome segregation after completion of DNA replication. DNA topoisomerases are enzymes that resolve the topological transitions of DNA, associated with replication, transcription and recombination (for review see (20)). They are divided into two types depending on whether they operate by cleaving one strand and passing the other strand through the break (type I) or by cleaving both strands and passing a DNA duplex through the DNA double strand break (type II). Most bacteria possess at least 3 DNA topoisomerases, one type I enzyme, DNA topoisomerase I encoded by the *topA* gene, and two type II enzymes, DNA gyrase and DNA topoisomerase IV (Topo IV) which are heterotetramers with 2 different subunits encoded by the *gyrA* and the *gyrB* genes and by the *parC* and *parE* genes, respectively. DNA topoisomerase I relaxes DNA while DNA gyrase introduces negative supercoils. These opposing activities allow the maintenance of DNA superhelicity in the cells. DNA topoisomerase I and DNA gyrase also act in concert to resolve topological constraints during replication and transcription. Because of these important physiological roles, DNA topoisomerase I and DNA gyrase are essential proteins for viability of bacterial cells (21-24). Topo IV is involved in decatenation of intertwined DNA intermediates generated during DNA replication and DNA recombination (25,26) and plays a major role in decatenation of daughter chromosomes before cell division (for reviews, (20,27,28)). Some bacteria, as *Escherichia coli*, possess, in addition to these 3 topoisomerases, a DNA topoisomerase III (Topo III), another type IA topoisomerase encoded by *topB* gene that might play a role in the unlinking of the DNA strands at the end of replication (29).

D. radiodurans has an atypic content of DNA topoisomerases: it possesses a DNA topoisomerase I encoded by the *DR_1374* (*topA*) gene, and a DNA gyrase encoded by *DR_1913* (*gyrA*) and *DR_0906* (*gyrB*) genes. DNA gyrase is the only type II DNA topoisomerase in this bacterium. Indeed, the sequence of the *D. radiodurans* genome does not reveal any homolog of *parC* or *parE* genes encoding the two subunits of Topo IV in *E. coli*. As some other bacteria, *D. radiodurans* also possesses another topoisomerase encoded by the *DR0_690* gene (*topIB* gene), belonging to the type IB family which includes eukaryotic nuclear topoisomerases and topoisomerases IB of poxviruses (30). *D. radiodurans* DNA gyrase was shown to be one of the main proteins involved in the organization of the *Deinococcus* nucleoids (31), but its biochemical properties have not been extensively characterized. Recently, Kota *et al* (32) showed by using a bacterial two-hybrid system that PprA interacts with DNA topoisomerase IB (Topo IB) and DNA gyrase from *D. radiodurans* and enhances the relaxation activity of Topo IB. They also showed that Δ *pprA* mutant

bacteria are sensitive to nalidixic acid, an inhibitor of bacterial type II DNA topoisomerases (32).

Here, in order to decipher the role of PprA in chromosome segregation, we used an *in vivo* approach to determine by shotgun proteomics putative PprA partners interacting and co-immuno-precipitating with PprA after exposure to γ -radiation. We found among them the two subunits of DNA gyrase and we decided to focus our work on the characterization of the activities of the deinococcal DNA gyrase in the presence or absence of PprA. We showed that treatment of bacteria with novobiocin, an inhibitor of DNA gyrase, resulted in defects in chromosome segregation aggravated in the absence of PprA. Our results suggest that PprA plays a major role in chromosome decatenation via its interaction with the deinococcal DNA gyrase when cells recover from exposure to ionizing radiation.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, DNA manipulations

The bacterial strains used are listed in Table 1. The *E. coli* strains used were DH5 α as the general cloning host and Rosetta 2 (DE3) pLysS (Novagen) for protein expression. *E. coli* strains were grown at 37°C in Lysogeny Broth (LB) or 2xYT medium (BIO101 Inc). All *D. radiodurans* strains were derivatives of strain R1 ATCC 13939. They were grown at 30°C in TGY2x (1% tryptone, 0.2% dextrose, 0.6% yeast extract) or plated on TGY1x containing 1.5% agar. When necessary, media were supplemented with the appropriate antibiotics used at the following final concentrations: kanamycin, 6 μ g/mL; chloramphenicol, 3.5 μ g/mL for *D. radiodurans*, and kanamycin 30 μ g/mL; chloramphenicol 35 μ g/mL; ampicillin 100 μ g/mL for *E. coli*.

Bacterial strains	Description	Source or reference
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU(ϕ80lacZAM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Laboratory stock
Rosetta 2 (DE3) pLysS	<i>F ompT hsdS_B(R_B⁻ m_B⁻) gal dcm λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>]) pLysSRARE (<i>cat</i>)</i>	Novagen
<i>D. radiodurans</i>		
R1	wild type, ATCC 13939	Laboratory stock
GY12830	<i>ddrB::SPA::cat</i>	(10)
GY 13338	<i>gyrA::SPA::cat</i>	(31)
GY 14615	<i>pprA::HA::kan</i>	(19)
GY 14641	Δ <i>pprA</i> Ω <i>kan gyrA::SPA::cat</i>	This work
GY 14661	Δ <i>pprA</i> Ω <i>cat</i>	This work
GY 14697	<i>pprA::HA::kan gyrA::SPA::cat</i>	This work
GY 15985	Δ <i>topIB</i> Ω <i>kan ΔpprA</i> Ω <i>cat</i>	This work
GY 15987	Δ <i>topIB</i> Ω <i>kan</i>	This work
GY16173	<i>ddrO::FLAG::cat</i>	(15)
GY 16179	<i>pprA::6his::kan</i>	This work

Table 1. Bacterial strains

Plasmids pET-26b, pET-30 Ek/LIC, and pET-21d were used to construct vectors for overexpression of *D. radiodurans* GyrA, GyrB and PprA proteins, respectively (Table 2). Plasmid DNA was extracted from *E. coli* using the QIAprep spin miniprep kit (Qiagen). All constructions were verified by DNA sequencing. Relaxed pHOT-1 DNA (2.6 kb) and kinetoplast DNA (kDNA) were purchased from TopoGEN.

Plasmids	Description	source or reference
pGTC101	source of chloramphenicol cassette	(33)
p11086	Source of kanamycin cassette in <i>D. radiodurans</i>	Laboratory stock
pET21d	PET expression system, pT7lac, C-terminal 6his tag, Amp ^R	Novagen
pET26b	PET expression system, pT7lac, C-terminal 6his tag, Kan ^R	Novagen
pET21d	PET expression system, pT7lac, N-terminal 6his tag, Kan ^R	Novagen
pET21d-pprA	pET21d <i>NcoI/XhoI</i> + PCR fragment containing <i>pprA</i>	This work
pET26b- <i>gyrA</i>	pET26b <i>NdeI/XhoI</i> + PCR fragment containing <i>gyrA</i>	This work
pET30 EK/LIC- <i>gyrB</i>	pET30Ek/LIC + PCR fragment containing <i>gyrB</i>	this work

Table 2. Plasmids

Alleles Δ *pprA* Ω *cat*, Δ *topIB* Ω *kan* and *pprA::6his::kan* were constructed by the tripartite ligation method (34). Transformation of *D. radiodurans* with PCR products or genomic DNA was performed as previously described (10). The genetic structure and the purity of the mutants were checked by PCR.

Chromosomal DNA of *D. radiodurans* was extracted as previously described (35). PCR amplification of DNA fragments using plasmid or genomic DNA as template was performed using Phusion DNA polymerase (Thermo Scientific) or Go Taq DNA polymerase (Promega). Oligonucleotides used in this study will be provided on request.

γ -irradiation treatment of *D. radiodurans*

Exponential cultures, grown in TGY2x were concentrated to an $A_{650\text{ nm}} = 20$ in TGY2x and irradiated on ice with a ¹³⁷Cs irradiation system (Institut Curie, Orsay or Paris, France) at 3.8 kGy (dose rate of 40.1 Gy/min).

Co-immunoprecipitation and western blot analysis of the samples

D. radiodurans bacteria, in which a bait protein has been tagged at its C-terminal end with a SPA or HA epitope, were grown in TGY2x and exposed or not to 3.8 kGy γ -radiation. Following irradiation, cultures were diluted in TGY2x to an $A_{650\text{ nm}} = 0.4$ and incubated at 30°C for 110min. Cells (50 mL) (with or without irradiation) were centrifuged and the pellets were suspended in 600 μ L of lysis buffer A (50mM Tris pH7.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.5% Triton100X) with 0.1 M of protease inhibitor (Pefabloc, Euromedex). Cells were disrupted with a FastPrep apparatus (FP120, Bio101), using 0.1g of glass beads (500 μ m) and 3 pulses of 30 s (speed: 4 m/s). Cell debris were removed by centrifugation at 4°C at 2000 g for 10 min. Approximately 500 μ L of supernatant were incubated with 2 μ g of monoclonal

antibody [monoclonal mouse anti-FLAG antibodies (Sigma-Aldrich) or monoclonal mouse anti-HA antibodies (Eurogentec)] at 10°C under gentle agitation for 2 hours for immune complex formation. 20 µL of Bio-Adembeads Protein G (Ademtech), washed twice in 20 µL of lysis buffer A using the Ademtech magnet, were suspended in 20 µL of lysis buffer. The washed beads were added to the supernatants treated with antibodies and the mixtures were incubated at 10°C under gentle agitation for 1 hour. The co-immuno-precipitated complexes bound to the beads were then washed five times with 500 µL of lysis buffer A using the Ademtech magnet before to be suspended in 35 µL of 1x Laemmli loading dye. Samples were heated at 95°C during 5 minutes, replaced on the magnet and the supernatants containing the enriched proteins were kept at -20°C before shotgun proteomics analyses (see below).

When the co-immuno-precipitated samples were prepared to be used for western blot analyses, cultures were treated with 2% formaldehyde for 20 min followed by a treatment with 0.3M glycine for 5 min before immuno-precipitation. Two different immunoprecipitations were performed using a *pprA::HA gyrA::SPA* strain expressing the two proteins tagged with different epitopes: the cell extracts were incubated with anti-HA antibodies or with anti-FLAG antibodies and the bound proteins were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-FLAG antibodies or anti-HA antibodies, respectively. For this purpose, proteins were transferred from the gel onto a PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane. The membrane was blocked with TBS containing 0.05% Tween 20 before being incubated overnight at 4°C with a 1:5000 dilution of monoclonal mouse anti-HA antibodies (Eurogentec) or monoclonal rabbit anti-FLAG antibodies (Sigma-Aldrich) in TBS containing 3% powdered milk, 0.05% Tween 20. After extensive washes in TBS with 0.05% Tween 20, the membrane was incubated with anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG, both coupled with alkaline phosphatase conjugate used as secondary antibody and revealed by a colorimetric reaction. Gels were analyzed by measuring intensity profiles for each lane using ImageLab software (Biorad).

Tandem mass spectrometry and proteomic data interpretation

The protein samples obtained by co-immunoprecipitation with the PprA::HA protein were heated at 95°C for 5 min and then loaded onto a 10% NuPAGE gel (Invitrogen) for a short electrophoresis in MOPS buffer. The proteins were briefly stained with Coomassie Blue Safe stain (Invitrogen). Polyacrylamide bands containing the whole enriched subproteomes were processed as previously described for further destaining and iodoacetamide treatments (36).

Samples were subjected for 4 h to proteolysis at 37°C with 10 ng/μl of sequencing-grade trypsin (Roche) in 50 mM NH₄HCO₃ and 0.01% of proteaseMAX surfactant (Promega) as described for maximizing peptide recovery (37). Reactions were stopped with 0.5% (final) trifluoroacetic acid. The resulting peptides (10 μl of the 40 μl generated with the procedure) were analysed with an LTQ-Orbitrap XL hybrid mass spectrometer (ThermoFisher) coupled to an UltiMate 3000 nanoLC System (Dionex-LC Packings) operating a reverse-phase Acclaim PepMap100 C18 μ-precolumn (5 μm, 100 Å, 300 μm inner diameter x 5 mm, Dionex) and a nanoscale Acclaim PepMap100 C18 capillary column (3 μm, 100 Å, 75 μm i.d. x 15 cm, Dionex) as described previously (38). Peptide mixtures (10 μl) were desalted online, and then resolved at a flow rate of 0.3 μl per min using a 90 min gradient from 5 to 60% solvent B (0.1% HCOOH / 80% CH₃CN) with 0.1% HCOOH / 100% H₂O as solvent A. The LTQ-orbitrap XL mass spectrometer was recalibrated internally in real time with polydimethylcyclsiloxane ions generated in the electrospray process from ambient air (monoprotonated [(CH₃)²SiO]⁶ with *m/z* at 445.120024) and operated in data-dependent mode using the TOP3 strategy as described (39). In brief, a scan cycle was initiated with a full scan of high mass accuracy from *m/z* 300 to 1,800 in the Orbitrap analyzer at a 30,000 resolution, followed by MS/MS scans in the LTQ linear ion trap on the three most abundant precursor ions, with dynamic exclusion of previously-selected ions. Peak lists were generated using the Mascot Daemon software (Matrix Science) and MS/MS spectra were assigned with the MASCOT search engine (version 2.2.04, Matrix Science) as described (Hartmann et al., 2014). The in-house *D. radiodurans* protein sequence database (31) comprised 3,311 polypeptide sequences, totaling 1,006,757 amino acids. Peptides were identified with a *p*-value threshold below 0.05. Protein spectral counts were normalized and compared with the PatternLab software with the Tfold and ACfold modules (40).

***In vivo* assay of *D. radiodurans* sensitivity to DNA gyrase inhibitors**

Cultures of exponentially growing cells at A_{650nm} = 0.3 were serially diluted and aliquots (10 μL) of each dilution were spotted on TGY agar supplemented or not with increasing concentrations of novobiocin or nalidixic acid. Plates were incubated at 30°C for 5 days.

Fluorescence microscopy

An overnight culture was diluted to A_{650nm} = 0.07 in fresh TGY2x medium containing or not novobiocin (40 ng/mL) and incubated at 30°C with agitation (150 rpm). At different times,

aliquots were removed and treated as previously described (24). DNA and membranes were stained with DAPI (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and FM4-64 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectively. The stained cells were observed using a Leica DM RXA microscope and images were analyzed using Image J software.

Western blot analysis of proteins belonging to the RDR regulon after novobiocin treatment

Novobiocin (40 ng/mL) was added or not to an exponential culture ($A_{650\text{nm}} = 0.3$) in TGY 2x medium. Cells were cultivated at 30°C and 20 mL aliquots were centrifuged at indicated times. The pellets were suspended in 150 μL of SSC 1x buffer and the cells were disrupted as described previously (41). After centrifugation, the protein concentration was measured (Bio-Rad protein assay dye reagent), and 5 or 10 μg of proteins were subjected to electrophoresis onto acrylamide gel. For detection of PprA::HA, DdrB::SPA and DdrO::FLAG proteins, the tagged PprA and DdrB proteins were separated onto a 12% Tris Glycine SDS-PAGE gel, and the tagged DdrO proteins were separated onto a 16% Tris Tricine SDS-PAGE gel. Proteins were then transferred onto a PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane and the membranes were treated with anti-HA or anti-FLAG antibodies as described upper.

Purification of the tagged PprA::6His protein

E. coli Rosetta (DE3) pLysS was transformed by pET21d-*pprA* and grown in 2xYT medium (BIO101 Inc.) supplemented with ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). When the cell culture reached an $A_{600\text{nm}} = 1$, PprA production was induced with 0.5 mM IPTG (Sigma) during 4 hours at 37°C. Cells were harvested by centrifugation, suspended in 40 mL buffer A (200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5), and stored overnight at -20°C. Cell lyses were completed by sonication (probe-tip sonicator Branson). The His-tagged PprA protein was purified on an Ni-NTA column (Qiagen Inc.), eluted with 200 mM imidazole in buffer A; loaded onto a SuperdexTM200 column (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrated against the same buffer. The PprA protein was concentrated using Vivaspin 5,000 nominal molecular weight limit cut-off centrifugal concentrators (Vivascience), flash frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C.

Purification of GyrA::6His and 6His::GyrB tagged proteins

Usually, to characterize the *in vitro* biochemical activities of bacterial gyrases, the GyrA and GyrB subunits are expressed and purified separately from pET vectors (42,43). The A subunit is expressed as a C-terminal 6His protein and the B subunit as an N-terminal 6His protein. After purification of GyrA and GyrB proteins, the DNA gyrase activity is reconstituted by mixing the two subunits.

To purify the deinococcal DNA gyrase, the *gyrA* (*DR1913*) and *gyrB* (*DR0906*) genes were amplified from genomic DNA and ligated with DNA of vectors pET26b and pET30Ek/LIC, respectively. The resulting plasmids were introduced in *E.coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS. Transformed cells were grown in 100 ml of LB medium supplemented with 30 µg/ml kanamycin and 35 µg/mL chloramphenicol until an A_{650nm} of 0.4-0.6. Expression of the tagged proteins was induced by IPTG at a final concentration of 1 mM. Growth was continued overnight at 20°C. Cells were harvested by centrifugation and the pellets were suspended in Binding Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.8, 800 mM NaCl, 5% glycerol and 20 mM imidazole) (0.1 mL for 1 OD) containing 0.03% Triton X-100. For the purification of 6His::GyrB, an EDTA-free protease inhibitor cocktail (Sigma) was added to the solution. The cells were disrupted using an Ultrasonic Cell Disrupter. The disrupted suspensions were centrifuged at 4°C (13000 g, 20 min) and the supernatants were loaded onto 0.5 mL Ni-NTA columns (Qiagen) equilibrated with Binding Buffer. The columns were washed initially with 5 ml of Binding Buffer, and followed by 4 steps of elution with 5 mL of a solution containing 20 mM Tris-HCl pH 7.8, 200 mM NaCl, 5% glycerol and increasing concentrations of imidazole (40 mM, 60 mM, 100 mM and 200 mM). According to their purity verified in an SDS-gel electrophoresis the protein fractions were pooled and dialyzed on a PD10 column against 3.5 mL of 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 200 mM NaCl and 30% glycerol according to the manufacturer protocol (GE Healthcare). The protein solutions were transferred to a fresh precooled tube, and dithiothreitol (DTT) and EDTA were added at a final concentration of 1 mM. The GyrA::6His and the 6His::GyrB proteins were aliquoted and stored at -80°C.

DNA supercoiling and decatenation assays

DNA supercoiling activity was assayed with the recombinant *D. radiodurans* GyrA and GyrB proteins, and relaxed pHOT-DNA (TopoGEN) as substrate. The reaction mixture (20 µL) contained 35mM Tris-HCl (pH 7.8), 24 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 1 mM ATP, 1.8 mM spermidine, 100 µg/mL BSA, 6.5% glycerol, relaxed pHOT-DNA (125 ng) and GyrA

and GyrB proteins in equal molar amounts. To test the effect of PprA, increasing amounts of PprA (or the equivalent volume of buffer) were added to the reaction mixtures. The mixture was incubated for 1h at 37°C and the reaction was terminated by the addition of 2 µL 10x BBSE Buffer (5% SDS, 100 mM EDTA, 50% glycerol, and 0.4% bromophenol blue). The samples were loaded onto a 1.2% agarose gel in TEP buffer (36 mM Tris-HCl pH7.8, 30 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA) and run for 3h at 50 V. The gel was stained with ethidium bromide (1 µg/mL) for 30 min. The bands were then visualized and quantified using the Image Lab (Bio-Rad) software.

For the decatenation assay, the reaction mixture was the same as those used in the supercoiling assay, except that the DNA substrate was replaced with kDNA (125 ng) (TopoGEN) and the incubation was performed at 37°C for 3h. The products were then analyzed as described for the DNA supercoiling assay.

The same *in vitro* DNA negative supercoiling and DNA decatenation assays were performed in the presence of increasing concentrations of novobiocin or nalidixic acid.

RESULTS

Shotgun mass spectrometry highlights the gyrase subunit A as a partner of PprA protein in γ -irradiated *D. radiodurans* cells

We have recently shown that PprA protein may play an important role in *D. radiodurans* by regulating chromosome segregation and restart of cell division after completion of DNA repair (19). Here, we used proteomic assays to identify possible PprA partners. The interacting proteins were trapped by co-immunoprecipitation with PprA. Immunoprecipitation was carried out using a deinococcal strain, GY14615, expressing a functional PprA::HA fusion protein from the native *pprA* promoter (19). Prior to immunoprecipitation, the cells were exposed to 3.8 KGy γ -radiation and allowed to recover in fresh medium during 110 min. This procedure allowed an optimal induction of the PprA::HA protein that is poorly expressed in non-irradiated cells (Devigne, 2013 #69}. Furthermore, some partners could interact with PprA only after DNA damage.

Three independent biological replicates were performed using irradiated or non-irradiated cells expressing a PprA::HA fusion protein and two independent biological replicates were performed using irradiated or non-irradiated $\Delta pprA$ cells as a negative control. Immuno-precipitated complexes obtained using anti-HA monoclonal antibodies from test and control samples were subjected to shotgun tandem mass spectrometry analysis with a high-resolution Orbitrap mass analyzer in order to identify and quantify the enriched proteins.

The entire set of detected proteins after irradiation in the immuno-precipitated samples is given in supplemental Table S1. It comprises 102 polypeptides uncovered through the assignment of 416 unique peptide sequences, 57 being certified by tandem mass spectrometry with at least two detected peptides. We first compared by label-free proteomics, the protein co-precipitated with PprA::HA after γ -irradiation versus the non-irradiated control in which PprA::HA protein is expressed at its basal level (comparison 1). As expected, the PprA::HA protein was identified only through 11 spectral counts when the cells were non-irradiated, while an average of 93 PprA::HA spectral counts was found for irradiated cells. Comparison 1 allowed identification of proteins that accumulate in response to the irradiation. To identify proteins interacting specifically with PprA, we compared proteins co-precipitated with PprA::HA protein after exposure to 3.8 KGy γ -radiation versus $\Delta pprA$ bacteria exposed to the same dose of irradiation (comparison 2). Proteins detected in both comparisons were considered as putative interacting partners of the PprA protein. Table 3 shows the eight most

relevant proteins with fold changes >2 in both comparisons, thus highly correlated with PprA::HA. Among them, the DNA gyrase subunit A is an interacting protein of PprA::HA after irradiation. Interestingly, the second subunit of the DNA gyrase is also found up-detected in both comparisons with a fold change of 2.0. We thus focused our attention on the DNA gyrase as a PprA interacting partner.

Gene	Function	Comparison 1 <i>pprA::HA</i> strain (3.8 KGy vs 0 KGy)		Comparison 2 3.8 KGy irradiation (<i>pprA::HA</i> versus Δ <i>pprA</i>)	
		Fold change	pvalue	Fold change	pvalue
DR_0309	Elongation factor Tu	7.2	1.95×10^{-2}	7.2	3.96×10^{-2}
DR_2508	Hexagonally packed intermediate layer surface protein	7.0	4.97×10^{-4}	2.1	8.69×10^{-2}
DR_1913	DNA gyrase_subunit A	4.8	6.90×10^{-2}	4.8	1.12×10^{-1}
DR_1983	30S ribosomal protein S1	2.9	6.88×10^{-2}	2.5	2.40×10^{-1}
DR_1624	RNA helicase	2.6	2.18×10^{-1}	2.6	2.90×10^{-1}
DR_1955	Extracellular solute-binding	2.4	2.49×10^{-2}	2.4	3.25×10^{-1}
DR_0607	Chaperonin groEL	2.4	2.49×10^{-2}	2.4	3.25×10^{-1}
DR_0906	DNA gyrase_subunit B	2.0	3.27×10^{-2}	2.0	4.10×10^{-1}

Table 3. Proteins co-precipitated with PprA::HA protein after γ irradiation. *D. radiodurans* *ApprA* (GY12251) and *pprA::HA* (GY14615) bacteria were either exposed (3.8 kGy) or not to γ -irradiation and allowed to recover in fresh medium for 110 min prior to performing a co-immunoprecipitation with anti HA antibodies. Immuno-precipitated materials were analyzed by mass spectrometry (Table S1). The eight proteins detected by shotgun proteomics with a >2 fold increase after irradiation (comparison 1, *pprA::HA*, 3.8 KGy versus 0 KGy) and with a >2 fold decrease after deletion of *pprA* (comparison 2, *pprA::HA*, 3.8 KGy versus Δ *pprA*, 3.8 KGy) are listed.

In order to confirm the physical interaction between PprA protein and GyrA subunit highlighted by mass spectrometry, we performed a cross immunoprecipitation experiment using a PprA::HA GyrA::SPA strain expressing the two proteins tagged with different epitopes. Both tagged proteins were functional as shown by the viability and the wild type radio-resistance of the engineered strain (data not shown). Immunoprecipitation was carried out on cell extracts from non-irradiated cells or from cells exposed to 3.8 KGy γ -radiation and allowed to recover for 110 min. Two different immunoprecipitations were performed: (i) the cell extracts were incubated with anti-HA antibodies and the bound proteins were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-FLAG antibodies to reveal the GyrA::SPA protein and, (ii) the cell extracts were incubated with anti-FLAG antibodies and the bound

proteins were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-HA antibodies to reveal the PprA::HA protein.

To check the specificity of our system, control experiments were performed with strains that did not express the PprA::HA protein (*gyrA::SPA* strain, Figure 1A) or the GyrA::SPA protein (*pprA::HA* strain, Figure 1B). After co-immunoprecipitation in these irradiated or non-irradiated *gyrA::SPA* and *pprA::HA* control strains, no signal was detected with anti-FLAG antibodies (Figure 1A) and anti-HA antibodies (Figure 1B), respectively. Our results obtained in the *pprA::HA gyrA::SPA* strain confirm a physical interaction between PprA and GyrA proteins *in vivo*. Indeed, the GyrA protein was specifically trapped by immunoprecipitation of PprA::HA (Figure 1A) and, conversely, the PprA protein was specifically trapped by immunoprecipitation of GyrA::SPA (Figure 1B). The interaction between the two proteins was detected only after exposure of the cells to γ -irradiation, suggesting that PprA is not expressed highly enough in non-irradiated cells to allow the detection of this interaction or the interaction between the two proteins only takes place during recovery from DNA damage.

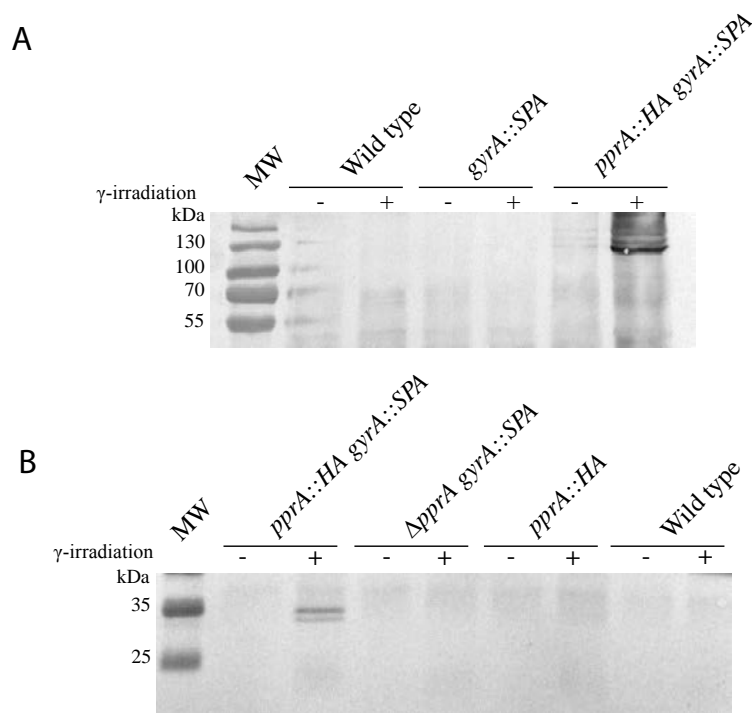


Figure 1. The GyrA subunit of DNA gyrase interacts with the PprA protein after irradiation. GY9613 (wild type), GY13338 (*gyrA::SPA*), GY14641 (Δ *pprA gyrA::SPA*), GY14615 (*pprA::HA*) and GY14697 (*pprA::HA gyrA::SPA*) cells were exposed to 3.8 KGy γ -radiation and grown for 110 min. Cells were fixed and immunoprecipitation performed. (A) Anti-HA antibodies were used to capture PprA-HA tagged protein by immunoprecipitation. Eluted samples were separated on 10% SDS-PAGE and primary anti-FLAG antibodies were used in western blots to reveal GyrA-SPA tagged proteins. (B) Anti-FLAG antibodies were used to capture GyrA-SPA tagged proteins by immunoprecipitation,

eluted samples were separated on 12% SDS-PAGE and primary anti-HA antibodies were used in western blots to reveal PprA-HA tagged proteins.

Loss of PprA renders the *D. radiodurans* cells hypersensitive to DNA gyrase inhibitors

The above results suggest that PprA might act with DNA gyrase after irradiation. Since the essentiality of the *gyrA* and *gyrB* genes (24,31) precluded the construction of a $\Delta pprA \Delta gyrA$ (or a $\Delta pprA \Delta gyrB$) homozygous mutant, we used drugs that inhibit gyrase activity to examine the effects of a *pprA* deletion in a gyrase-defective context. As previously shown (32), $\Delta pprA$ cells were hypersensitive to nalidixic acid that targets the GyrA subunit of DNA gyrase (Figure 2). Here, we showed that $\Delta pprA$ cells were also hypersensitive to novobiocin, a drug that targets the GyrB subunit of DNA gyrase (Figure 2). Kota *et al.* showed that PprA also interacts with Topo IB and enhances the relaxation activity of this enzyme *in vitro* (32). However, in our study, we did not find Topo IB as an interacting partner of PprA. Moreover, we did not observe any effect of the absence of Topo IB on *D. radiodurans* sensitivity to UV- or γ -irradiation [data not shown and (44)] or any increased sensitivity to nalidixic acid or novobiocin of $\Delta topIB$ or $\Delta pprA \Delta topIB$ mutants as compared with those observed in wild type or $\Delta pprA$ bacteria, respectively (Figure 2).

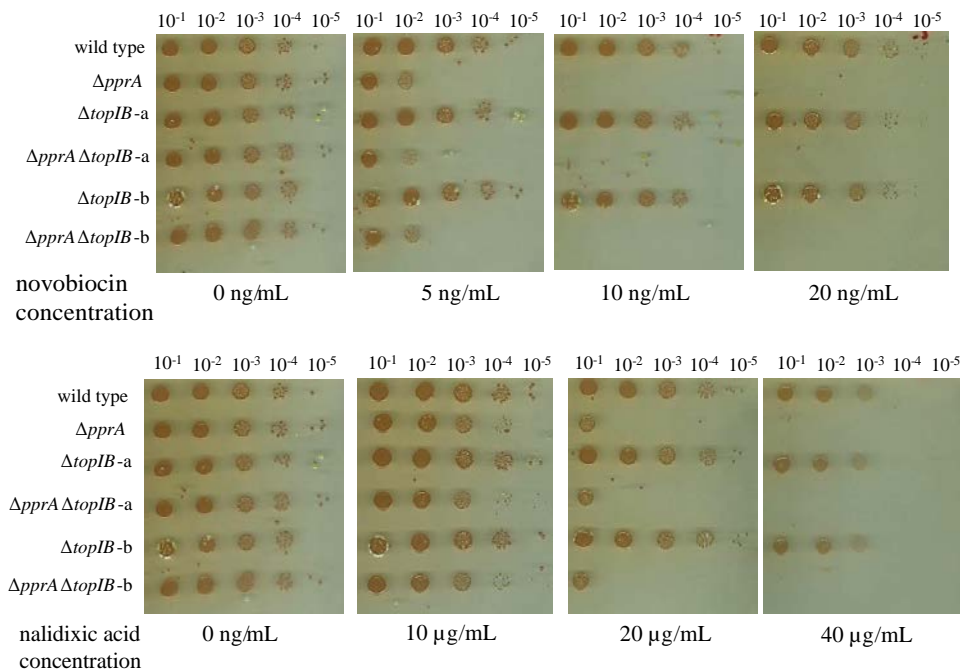


Figure 2. Survival of R1, *ApprA*, *AtopIB*, and *ApprA AtopIB* mutants after treatment with gyrase inhibitors. Serial dilutions of cultures of GY9613 (wild type), GY14661 ($\Delta pprA$), GY15987 ($\Delta topIB$) (2 clones a and b) and GY15985 ($\Delta pprA \Delta topIB$) (2 clones a and b) strains were spotted on plates in the presence or absence of novobiocin or nalidixic acid at the indicated concentrations, and plates were incubated at 30°C for 5 days.

Defects in segregation of cells exposed to novobiocin are increased in $\Delta pprA$ mutants

An analysis of cell morphology during recovery of *D. radiodurans* cells from γ - irradiation showed that a PprA deficiency results in defective chromosome segregation and aberrant cell division (19). In *E. coli*, the Topo IV enzyme play a key role in chromosome segregation by resolving catenated chromosomes generated during replication (25). In *D. radiodurans* lacking Topo IV, DNA gyrase, the only topoisomerase II present in the cells, has to accomplish this role. We expected that inhibition of DNA gyrase by drugs would result in defective chromosome partitioning. This defect could be exacerbated by a PprA deficiency accounting for hypersensitivity of $\Delta pprA$ bacteria to nalidixic acid and novobiocin. Therefore, we analyzed the cell morphologies after treatment with novobiocin. For this purpose, samples of wild type and $\Delta pprA$ cultures were taken at different times after addition of novobiocin and analyzed by fluorescence microscopy (Figure 3).

No aberrant cell morphologies were observed in the absence of novobiocin for both $\Delta pprA$ and wild type cells (Figure S1). In contrast, treatment of the wild type strain with novobiocin resulted in morphological abnormalities including anucleated cells and defects in segregation of the nucleoids. The absence of the PprA protein aggravated the morphological defects visualized after novobiocin treatment (Figure 3). Indeed, 8 hours after addition of novobiocin, the DNA remained trapped into the septum in dividing cells, giving rise to the various forms schematized in Figure 3B. Large field images confirmed that these abnormalities were present in > 90% of the cells (Figure S1).

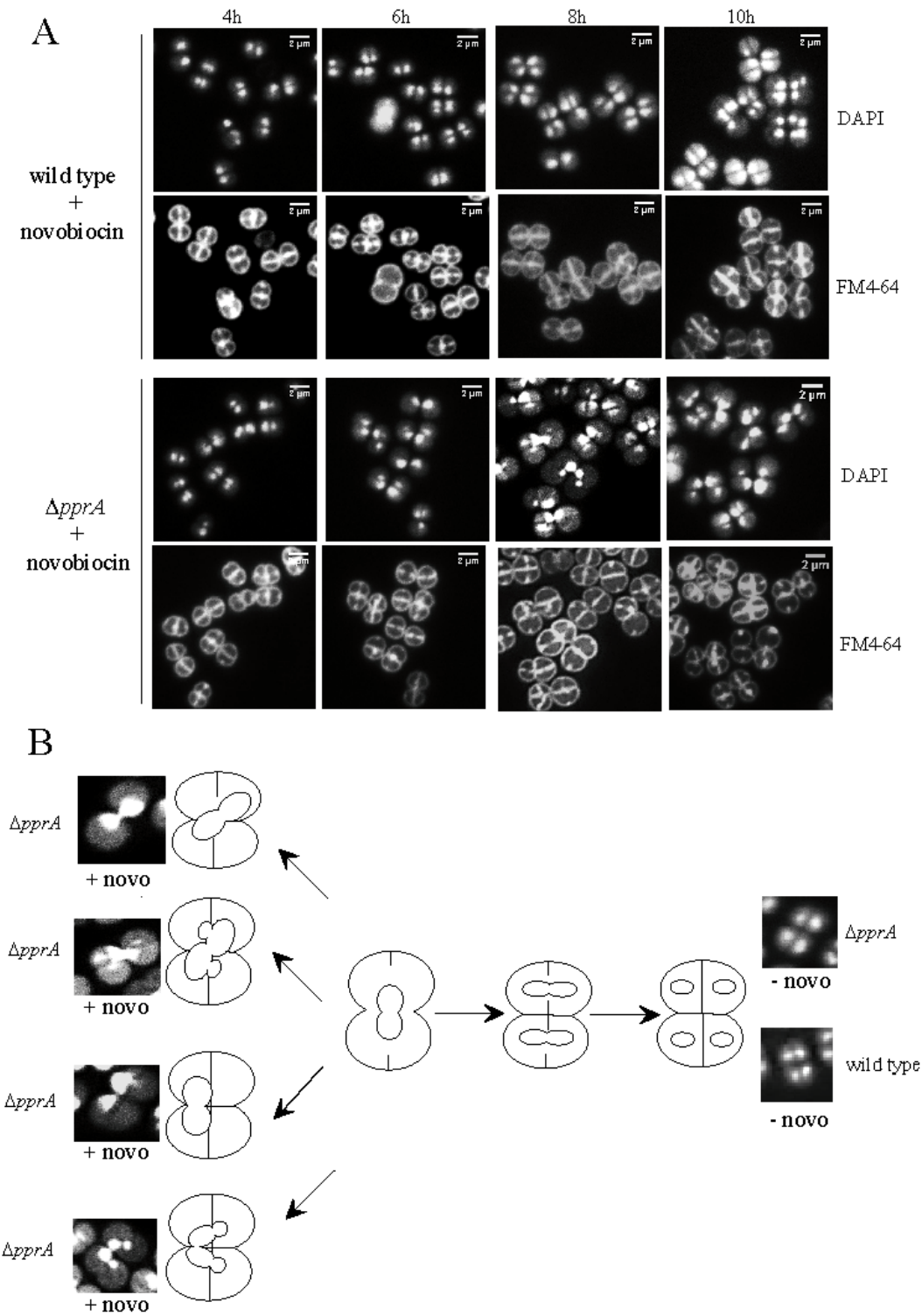


Figure 3. Morphology of wild type and Δ *pprA* mutant cells grown in the presence of novobiocin. (A) Cells were grown in the presence of 40 ng/mL of novobiocin. Samples were taken at the indicated times after addition of novobiocin and examined by fluorescence microscopy. DNA was stained with DAPI and membranes were stained with FM4-64. (B) Various abnormal forms of Δ *pprA* nucleoids observed after 8 hours of growth in presence of novobiocin. The *wt* and Δ *pprA* controls represent the cells grown without novobiocin. A schematic representation of the *D. radiodurans* dividing cells is also shown.

Novobiocin treatment induces the RDR regulon

As novobiocin treatment induces the SOS system in *E. coli* and *Bacillus subtilis* (45,46), we tested the effect of novobiocin on the radiation desiccation response (RDR), the major response to DNA damage generated by ionizing radiation in *D. radiodurans* (13,47). The induction of the RDR regulon results from proteolytic degradation of the DdrO repressor by an activated form of the metalloprotease IrrE (14,15).

To test if novobiocin treatment induced the RDR regulon, we examined, in the presence or absence of novobiocin, the level of three different proteins, PprA and DdrB whose expression is highly induced during the radiation desiccation response (RDR), and DdrO, whose level was expected to decrease during the course of the novobiocin treatment. The PprA::HA, DdrB::SPA and DdrO::FLAG proteins were visualized by western blot analysis using anti-HA or anti-FLAG antibodies. As can be seen in Figure 4, a faint band corresponding to the PprA::HA protein was detected in non-treated cells, but the signal markedly increased during the treatment with novobiocin. The results also clearly indicate that the DdrB::SPA protein was induced at early times after addition of novobiocin (Figure 4). In contrast, we observed a quick decrease in the level of the DdrO repressor in novobiocin-treated cells (Figure 4). From these results, we conclude that novobiocin induces the RDR regulon in *D. radiodurans*. Our recent results suggest that induction of the RDR regulon might be triggered by the oxidative stressed state of the cells (15). An oxidative stressed state might result from novobiocin treatment since it was shown that, in *E. coli*, nalidixic acid and other bactericidal antibiotics generate free radicals responsible for cell killing (48).

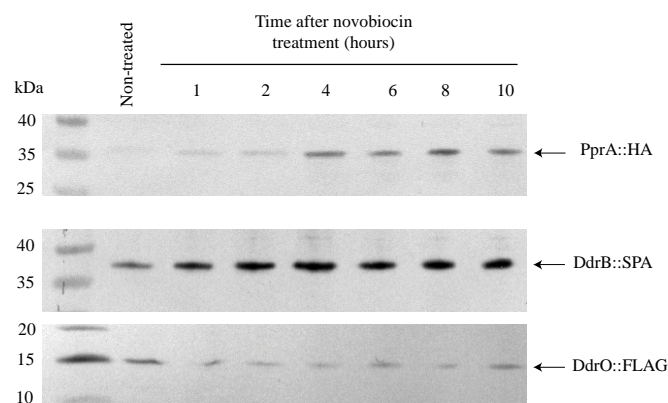


Figure 4. PprA and DdrB are induced whereas DdrO concentration decrease after novobiocin treatment. *D. radiodurans* GY14615 (*pprA::HA*), GY12830 (*ddrB::SPA*) and GY16173 (*ddrO::FLAG*) cells were incubated in the presence or absence of novobiocin for the indicated times. Cells extracts were subjected to SDS-PAGE and analyzed by western blotting with anti-HA antibodies for PprA::HA detection and anti-FLAG antibodies for DdrB::SPA and DdrO::FLAG detection.

PprA stimulates decatenation activity of *D. radiodurans* DNA gyrase

Our *in vivo* data suggest that PprA might interact with GyrA and modulate the DNA gyrase activities in cells recovering from DNA damage. To test this possibility, we sought to determine the effects of purified PprA protein on the *in vitro* activities of the Deinococcal DNA gyrase. The DNA gyrase is the sole type II topoisomerase encoded by the *D. radiodurans* genome and is expected to possess both relaxing/supercoiling and catenation/decatenation activities that are also ensured by other bacterial DNA gyrases (For review, see (49)). We first purified the two subunits of the deinococcal DNA gyrase. GyrA (as a C-terminal 6His-tagged protein) and GyrB (as an N-terminal 6-His-tagged protein) were overproduced in *E. coli*, purified (Figure S2), and mixed in equimolar amounts to reconstitute the DNA gyrase holoenzyme.

The DNA negative supercoiling activity of the DNA gyrase was measured using relaxed pHOT-DNA as substrate. The combination of GyrA and GyrB subunits led to the formation of intermediate topoisomers and supercoiled DNA when the concentration of DNA gyrase increased (Figure 5A). The decatenation activity was tested using the catenated kDNA as substrate that allows monitoring the unlinking of DNA minicircles. We observed that DNA gyrase of *D. radiodurans* was able to decatenate the kDNA (Figure 6A). A supercoiled form of DNA minicircles was also produced, due to the supercoiling activity of DNA gyrase (Figure 6A). Neither GyrA nor GyrB subunit alone exhibited DNA supercoiling or decatenation activities indicating that the activities observed in our assays were not due to a contamination by DNA gyrase or Topo IV from the *E. coli* host (Figure S3).

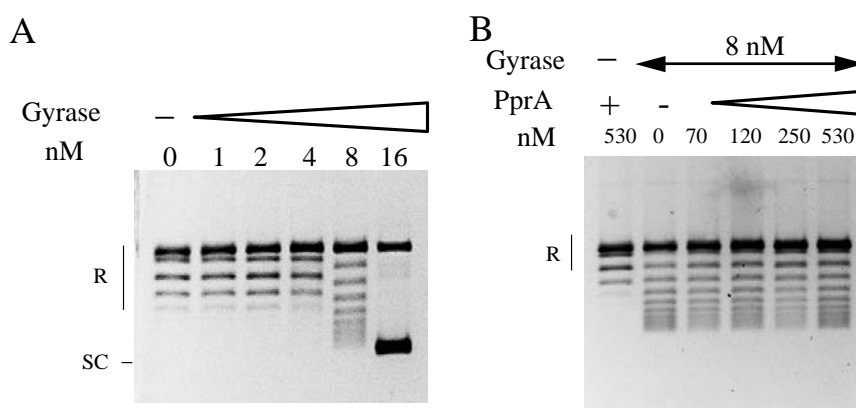


Figure 5. Assay for the DNA negative supercoiling activity of the *D. radiodurans* DNA gyrase. DNA gyrase was reconstituted by mixing the GyrA and GyrB subunits in equimolar amounts. (A) Relaxed pHOT plasmid DNA was incubated with the indicated increasing concentrations of DNA gyrase. SC, supercoiled plasmid DNA; R, relaxed plasmid DNA. (B) Effect of PprA on the DNA negative supercoiling activity of DNA gyrase. Relaxed pHOT DNA was incubated with DNA gyrase (8 nM) in the presence of the indicated increasing concentrations of PprA.

Furthermore, we tested the supercoiling and decatenation activities of DNA gyrase in presence of increasing concentrations of novobiocin or nalidixic acid and we showed that the two activities were inhibited *in vitro* by the drugs (Figure S4).

To test the effects of PprA on the gyrase activities, we purified a PprA::6His tagged protein (Figure S2). In order to verify that the recombinant His-tagged PprA protein is functional, we constructed a *D. radiodurans* strain expressing the PprA::6His protein by allelic replacement of the wild type *pprA* gene by its tagged counterpart. We showed that these bacteria were as resistant to nalidixic acid as were the wild type bacteria (Figure S5), demonstrating the functionality of the tagged PprA protein. Increasing amounts of the purified PprA::6His protein were included in the supercoiling or decatenation reactions. As can be seen in Figure 5B, PprA had no effect on the negative supercoiling activity of DNA gyrase. In contrast, it stimulated the decatenase activity of DNA gyrase. Indeed, PprA increased the amount of the decatenated minicircle products in the presence of DNA gyrase in a dose-dependent manner (about a 7-fold increase at the highest PprA concentration) (Figures 6B and 6C).

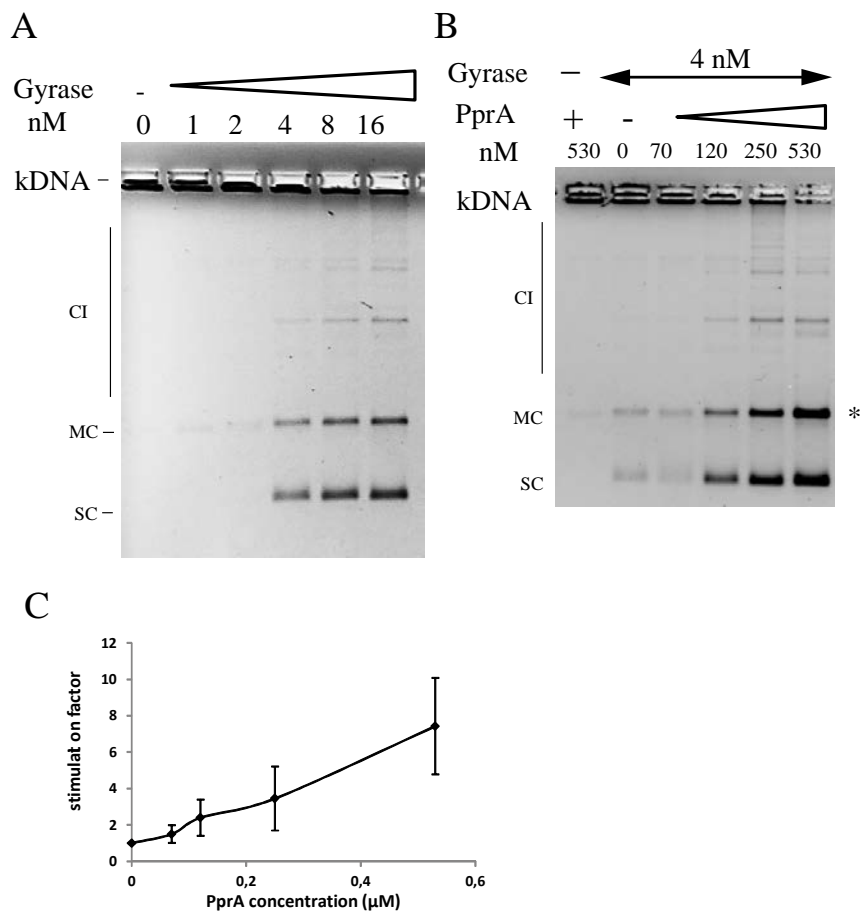


Figure 6. PprA stimulates decatenation activity of *D. radiodurans* DNA gyrase. (A) kDNA was incubated with the indicated increasing concentrations of DNA gyrase. kDNA was retained in the wells of the agarose gel. (B) Effect of PprA on the decatenation activity of DNA gyrase. DNA gyrase (4 nM) was incubated with kDNA in the presence of the indicated increasing concentrations of PprA (C) Stimulation of DNA decatenation by PprA. The ratio of the minicircles released in the presence of PprA over the mini circles released in the absence of PprA was determined at each PprA concentration and the average from four independent experiments was plotted. SC, supercoiled mini circles; MC, minicircles; CI, catenated intermediates.

DISCUSSION

The *pprA* gene is a *Deinococcus* specific gene highly induced after exposure to ionizing radiation or desiccation and its deletion renders *D. radiodurans* mutant cells highly sensitive to γ -irradiation. Remarkably, the major phenotypes observed in cells devoid of PprA after exposure to γ -radiation are defects in DNA segregation and cell division after completion of DNA repair (19). In wild type cells, PprA is recruited early after irradiation onto the nucleoid and localizes later through the septum of dividing cells when DNA repair is completed (19). Here, we determined, by coimmunoprecipitation and shotgun proteomics, the *in vivo* direct or indirect interactants of PprA in cells exposed to 3.8 kGy γ irradiation. Among the PprA interactants, we found the GyrA and the GyrB proteins. These results are in agreement with the direct interaction of PprA with the GyrA subunit of DNA gyrase previously observed using an *E. coli* bacterial two hybrid system (32).

Most bacteria possess two type II topoisomerases, DNA gyrase and Topo IV. DNA gyrase plays a major role in maintaining the global level of negative supercoiling of the chromosomes, while Topo IV is mainly a potent decatenase required for partitioning of the daughter chromosomes at the end of DNA replication (25,50,51). *D. radiodurans* lacks Topo IV. Thus, it is expected that the deinococcal DNA gyrase will also ensure the Topo IV-mediated functions in chromosome segregation. In *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*, DNA gyrase is also the unique type II topoisomerase present in the cells and it was shown that it exhibits a strong decatenase activity (52). Here, we assayed the activities of the deinococcal DNA gyrase *in vitro*. We showed that it possesses both DNA negative supercoiling and the DNA decatenation activities, and that both activities are sensitive to nalidixic acid and novobiocin inhibitors. Moreover, the PprA protein, shown to interact with the GyrA subunit of DNA gyrase, was able to stimulate *in vitro* the DNA decatenation activity of DNA gyrase without affecting its DNA negative supercoiling activity. *In vivo*, the absence of PprA increased the cell sensitivity to nalidixic acid and to novobiocin and aggravated the morphological defects observed in cells treated with novobiocin. After exposure to γ -radiation, the absence of PprA results in major defects in DNA segregation and cell division after completion of DNA repair (19).

In *E. coli*, newly duplicated origin regions segregate to opposite sides of the cell soon after initiation of replication, while segregation of the terminus region occurs very late in the cell cycle, as the daughter cells separate (53). We recently showed that *D. radiodurans* also presents prolonged colocalization of the Ter domain of chromosome 1 (54) and the

segregation delay of the terminus is enhanced after irradiation (54). This suggests that the activities of the deinococcal DNA gyrase have to be regulated to control chromosome decatenation. The GyrA and GyrB proteins are largely distributed inside the nucleoid in non-irradiated as well as in irradiated *D. radiodurans* cells (31,55).

After irradiation, DNA is shattered into hundreds of fragments. Even after reconstitution of circular chromosomes, irradiated cells are expected to contain a large amount of relaxed DNA that might pointlessly recruit DNA gyrase. The PprA protein, by its localization through the septum after completion of DNA repair (19,56), might facilitate, by its interaction with GyrA, re-localization of the DNA gyrase at the septum. It has been shown that PprA polymerizes along dsDNA (17). Thus, we can also propose that PprA, like the MukB condensin in *E. coli*, may remodel the DNA and generate a preferred substrate for DNA gyrase, and thus, that the PprA-GyrA interaction might increase the effective rate of DNA decatenation.

In non-irradiated cells, PprA is expressed at a low basal level and is not detected by immunofluorescence microscopy. Moreover, its absence has no effect on the viability and the morphology of the cells that divide normally (19). Thus, we can imagine that, as *E. coli* Topo IV, whose decatenation activity is regulated through a physical interaction of the ParC subunit with FtsK, MreB or MukB (57-59), the deinococcal DNA gyrase decatenation activity could be regulated by its interaction with key proteins involved in chromosome segregation or cell division. FtsK and SMC, a functional analog of MukB, are present in *D. radiodurans*, but, contrary to the rod shaped *Deinococcus deserti* bacteria, *D. radiodurans* bacteria do not encode a homolog of the *E. coli* MreB protein. We have previously shown that the absence of SMC in *D. radiodurans* does not disturb chromosome segregation (41). Further studies will be required for a better understanding of the regulation of chromosome segregation and cell division in *D. radiodurans*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Adriana Bailone for valuable discussions, suggestions and critical reading of the manuscript, Michael DuBow for polishing our English, Dyana Sanchez for her help in protein purification and the Institut Curie for the use of the ¹³⁷Cs irradiation system.

FUNDINGS

This work was supported by the Université Paris-Sud, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Agence Nationale de la Recherche (ANR-07-BLAN-0106-02 to JA and SS, ANR 11BSV3-01701 to SS), and Electricité de France (RB2011-17 to SS).

REFERENCES

1. Cox, M.M. and Battista, J.R. (2005) *Deinococcus radiodurans* - the consummate survivor. *Nat Rev Microbiol*, **3**, 882-892.
2. Slade, D. and Radman, M. (2011) Oxidative Stress Resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **75**, 133-191.
3. Krisko, A. and Radman, M. (2013) Biology of extreme radiation resistance: the way of *Deinococcus radiodurans*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **5**, a012765.
4. Zahradka, K., Slade, D., Bailone, A., Sommer, S., Averbeck, D., Petranovic, M., Lindner, A.B. and Radman, M. (2006) Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. *Nature.*, **443**, 569-573. Epub 2006 Sep 2027.
5. Daly, M.J. and Minton, K.W. (1995) Interchromosomal recombination in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol*, **177**, 5495-5505.
6. Slade, D., Lindner, A.B., Paul, G. and Radman, M. (2009) Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans*. *Cell*, **136**, 1044-1055.
7. Bentchikou, E., Servant, P., Coste, G. and Sommer, S. (2010) A major role of the RecFOR pathway in DNA double-strand-break repair through ESDSA in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS Genet*, **6**, e1000774.
8. Daly, M.J. and Minton, K.W. (1996) An alternative pathway of recombination of chromosomal fragments precedes *recA*-dependent recombination in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol*, **178**, 4461-4471.
9. Xu, G., Lu, H., Wang, L., Chen, H., Xu, Z., Hu, Y., Tian, B. and Hua, Y. (2010) DdrB stimulates single-stranded DNA annealing and facilitates RecA-independent DNA repair in *Deinococcus radiodurans*. *DNA Repair (Amst)*, **9**, 805-812.
10. Bouthier de la Tour, C., Boissard, S., Norais, C., Toueille, M., Bentchikou, E., Vannier, F., Cox, M.M., Sommer, S. and Servant, P. (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.
11. Narumi, I., Satoh, K., Cui, S., Funayama, T., Kitayama, S. and Watanabe, H. (2004) PprA: a novel protein from *Deinococcus radiodurans* that stimulates DNA ligation. *Mol Microbiol*, **54**, 278-285.
12. Kota, S., Kamble, V.A., Rajpurohit, Y.S. and Misra, H.S. (2010) ATP-type DNA ligase requires other proteins for its activity *in vitro* and its operon components for radiation resistance in *Deinococcus radiodurans in vivo*. *Biochem Cell Biol*, **88**, 783-790.
13. Makarova, K.S., Omelchenko, M.V., Gaidamakova, E.K., Matrosova, V.Y., Vasilenko, A., Zhai, M., Lapidus, A., Copeland, A., Kim, E., Land, M. *et al.* (2007) *Deinococcus geothermalis*: the pool of extreme radiation resistance genes shrinks. *PLoS One*, **2**, e955.
14. Ludanyi, M., Blanchard, L., Dulermo, R., Brandelet, G., Bellanger, L., Pignol, D., Lemaire, D. and de Groot, A. (2014) Radiation response in *Deinococcus deserti*: IrrE is a metalloprotease that cleaves repressor protein DdrO. *Mol Microbiol*, **94**, 434-449.
15. Devigne, A., Ithurbide, S., Bouthier de la Tour, C., Passot, F., Mathieu, M., Sommer, S. and Servant, P. (2015) DdrO is an essential protein that regulates the radiation desiccation response and the apoptotic-like cell death in the radioresistant *Deinococcus radiodurans* bacterium. *Mol Microbiol*, **96**, 1069-1084.
16. Wang, Y., Xu, Q., Lu, H., Lin, L., Wang, L., Xu, H., Cui, X., Zhang, H., Li, T. and Hua, Y. (2015) Protease activity of PprI facilitates DNA damage response: Mn²⁺-dependence and substrate sequence-specificity of the proteolytic reaction. *PLoS One*, **10**, e0122071.
17. Adachi, M., Hirayama, H., Shimizu, R., Satoh, K., Narumi, I. and Kuroki, R. (2014) Interaction of double-stranded DNA with polymerized PprA protein from *Deinococcus radiodurans*. *Protein Sci*, **23**, 1349-1358.

18. Kota, S. and Misra, H.S. (2008) Identification of a DNA processing complex from *Deinococcus radiodurans*. *Biochem Cell Biol*, **86**, 448-458.
19. 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.
20. Champoux, J.J. (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem*, **70**, 369-413.
21. DiNardo, S., Voelkel, K.A., Sternglanz, R., Reynolds, A.E. and Wright, A. (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell*, **31**, 43-51.
22. Drlica, K. and Zhao, X. (1997) DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev*, **61**, 377-392.
23. Lecointe, F., Coste, G., Sommer, S. and Bailone, A. (2004) Vectors for regulated gene expression in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Gene*, **336**, 25-35.
24. Nguyen, H.H., de la Tour, C.B., Toueille, 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.
25. Adams, D.E., Shekhtman, E.M., Zechiedrich, E.L., Schmid, M.B. and Cozzarelli, N.R. (1992) The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell*, **71**, 277-288.
26. Zechiedrich, E.L. and Cozzarelli, N.R. (1995) Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, **9**, 2859-2869.
27. Forterre, P., Gribaldo, S., Gabelle, D. and Serre, M.C. (2007) Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie*, **89**, 427-446.
28. Khodursky, A.B., Peter, B.J., Schmid, M.B., DeRisi, J., Botstein, D., Brown, P.O. and Cozzarelli, N.R. (2000) Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9419-9424.
29. Hiasa, H. and Marians, K.J. (1994) Topoisomerase III, but not topoisomerase I, can support nascent chain elongation during theta-type DNA replication. *J Biol Chem*, **269**, 32655-32659.
30. Krogh, B.O. and Shuman, S. (2002) A poxvirus-like type IB topoisomerase family in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 1853-1858.
31. Toueille, M., Mirabella, B., Guerin, P., Bouthier de la Tour, C., Boisnard, S., Nguyen, H.H., Blanchard, L., Servant, P., de Groot, A., Sommer, S. *et al.* (2012) A comparative proteomic approach to better define *Deinococcus* nucleoid specificities. *J Proteomics*, **75**, 2588-2600.
32. Kota, S., Charaka, V.K., Ringgaard, S., Waldor, M.K. and Misra, H.S. (2014) PprA contributes to *Deinococcus radiodurans* resistance to nalidixic acid, genome maintenance after DNA damage and interacts with deinococcal topoisomerases. *PLoS One*, **9**, e85288.
33. Earl, A.M., Rankin, S.K., Kim, K.P., Lamendola, O.N. and Battista, J.R. (2002) Genetic evidence that the *uvrE* gene product of *Deinococcus radiodurans* R1 is a UV damage endonuclease. *J Bacteriol*, **184**, 1003-1009.
34. Menecier, 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.
35. Norais, C., Servant, P., Bouthier-de-la-Tour, C., Coureux, P.D., Ithurbide, S., Vannier, F., Guerin, P.P., Dulberger, C.L., Satyshur, K.A., Keck, J.L. *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.
36. de Groot, A., Dulerio, R., Ortet, P., Blanchard, L., Guerin, P., Fernandez, B., Vacherie, B., Dossat, C., Jolivet, E., Siguier, P. *et al.* (2009) Alliance of proteomics and genomics to unravel the specificities of Sahara bacterium *Deinococcus deserti*. *PLoS Genet*, **5**, e1000434.

37. Hartmann, E.M., Allain, F., Gaillard, J.C., Pible, O. and Armengaud, J. (2014) Taking the shortcut for high-throughput shotgun proteomic analysis of bacteria. *Methods Mol Biol*, **1197**, 275-285.
38. Clair, G., Armengaud, J. and Duport, C. (2012) Restricting fermentative potential by proteome remodeling: an adaptive strategy evidenced in *Bacillus cereus*. *Mol Cell Proteomics*, **11**, M111 013102.
39. Yang, Y.S., Fernandez, B., Lagorce, A., Aloin, V., De Guillen, K.M., Boyer, J.B., Dedieu, A., Confalonieri, F., Armengaud, J. and Roumestand, C. (2015) Prioritizing targets for structural biology through the lens of proteomics: the archaeal protein TGAM_1934 from *Thermococcus gammatolerans*. *Proteomics*, **15**, 114-123.
40. Carvalho, P.C., Hewel, J., Barbosa, V.C. and Yates, J.R., 3rd. (2008) Identifying differences in protein expression levels by spectral counting and feature selection. *Genet Mol Res*, **7**, 342-356.
41. 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.
42. Huang, Y.Y., Deng, J.Y., Gu, J., Zhang, Z.P., Maxwell, A., Bi, L.J., Chen, Y.Y., Zhou, Y.F., Yu, Z.N. and Zhang, X.E. (2006) The key DNA-binding residues in the C-terminal domain of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase A subunit (GyrA). *Nucleic Acids Res*, **34**, 5650-5659.
43. Pan, X.S. and Fisher, L.M. (1999) *Streptococcus pneumoniae* DNA gyrase and topoisomerase IV: overexpression, purification, and differential inhibition by fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**, 1129-1136.
44. Makarova, K.S., Aravind, L., Wolf, Y.I., Tatusov, R.L., Minton, K.W., Koonin, E.V. and Daly, M.J. (2001) Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiol Mol Biol Rev*, **65**, 44-79.
45. Smith, C.L. (1983) *recF*-dependent induction of *recA* synthesis by coumermycin, a specific inhibitor of the B subunit of DNA gyrase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 2510-2513.
46. Osburne, M.S., Zavodny, S.M. and Peterson, G.A. (1988) Drug-induced relaxation of supercoiled plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and induction of the SOS response. *J Bacteriol*, **170**, 442-445.
47. 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.
48. Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Hayete, B., Lawrence, C.A. and Collins, J.J. (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, **130**, 797-810.
49. Collin, F., Karkare, S. and Maxwell, A. (2011) Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, **92**, 479-497.
50. Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S. and Suzuki, H. (1990) New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell*, **63**, 393-404.
51. Peng, H. and Marians, K.J. (1993) Decatenation activity of topoisomerase IV during *oriC* and pBR322 DNA replication *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8571-8575.
52. Manjunatha, U.H., Dalal, M., Chatterji, M., Radha, D.R., Visweswariah, S.S. and Nagaraja, V. (2002) Functional characterisation of mycobacterial DNA gyrase: an efficient decatenase. *Nucleic Acids Res*, **30**, 2144-2153.
53. Li, Y., Sergueev, K. and Austin, S. (2002) The segregation of the *Escherichia coli* origin and terminus of replication. *Mol Microbiol*, **46**, 985-996.
54. Passot, F.M., Nguyen, H.H., Dard-Dascot, C., Thermes, C., Servant, P., Espeli, O. and Sommer, S. (2015) Nucleoid Organization in the Radioresistant Bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mol Microbiol*.
55. Bouthier de la Tour, C., Passot, F.M., Toueille, M., Mirabella, B., Guerin, P., Blanchard, L., Servant, P., de Groot, A., Sommer, S. and Armengaud, J. (2013) Comparative proteomics

- reveals key proteins recruited at the nucleoid of *Deinococcus* after irradiation-induced DNA damage. *Proteomics*, **13**, 3457-3469.
56. Kota, S., Charaka, V.K. and Misra, H.S. (2014) PprA, a pleiotropic protein for radioresistance, works through DNA gyrase and shows cellular dynamics during postirradiation recovery in *Deinococcus radiodurans*. *J Genet*, **93**, 349-354.
 57. Espeli, O., Lee, C. and Marians, K.J. (2003) A physical and functional interaction between *Escherichia coli* FtsK and topoisomerase IV. *J Biol Chem*, **278**, 44639-44644.
 58. Madabhushi, R. and Marians, K.J. (2009) Actin homolog MreB affects chromosome segregation by regulating topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *Mol Cell*, **33**, 171-180.
 59. Hayama, R. and Marians, K.J. (2010) Physical and functional interaction between the condensin MukB and the decatenase topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 18826-18831.

Supplemental data

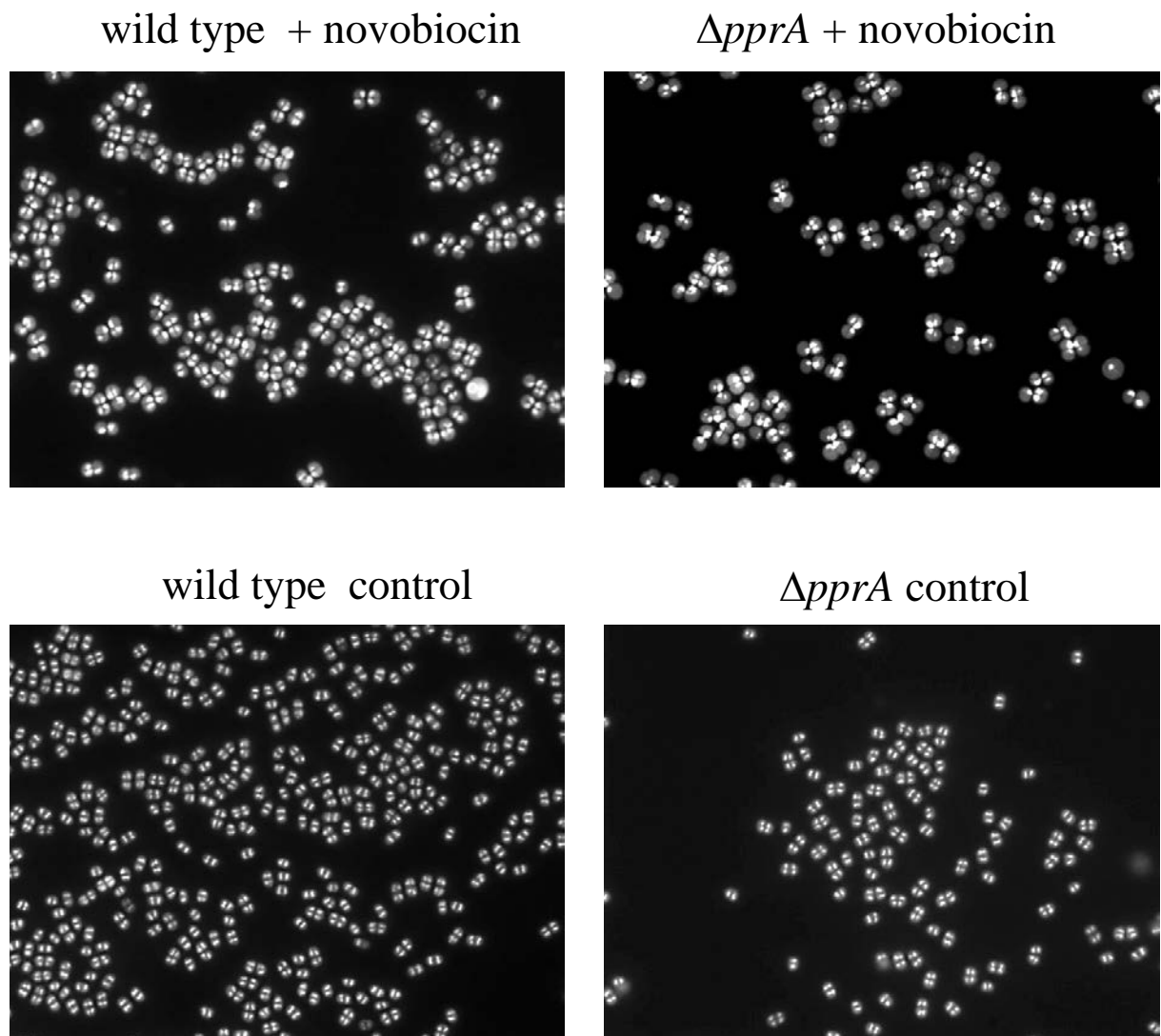


Figure S1. Large field images of wild type and $\Delta pprA$ cells grown for 8 hours with (upper panels) or without (lower panels) novobiocin. Nucleoids were stained with DAPI.

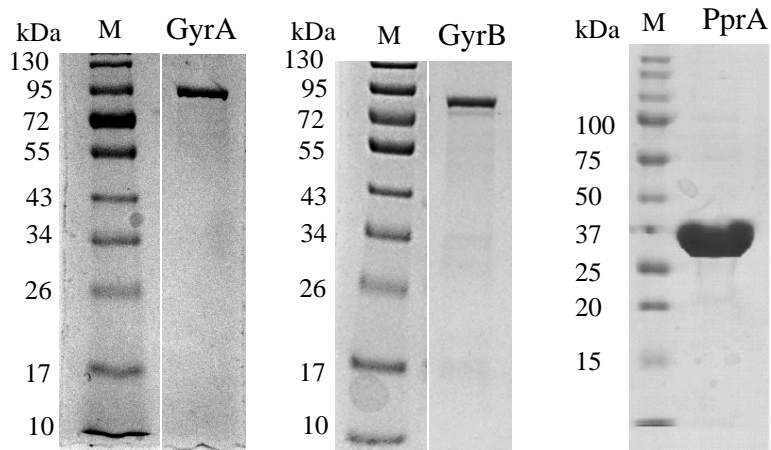


Figure S2: Purification of GyrA, GyrB and PprA proteins. SDS-PAGE analysis of purified recombinant GyrA, GyrB subunits and PprA proteins. Approximately 1 μ g of GyrA and GyrB proteins and 10 μ g of PprA protein were loaded on an SDS-10% polyacrylamide gel. Proteins were revealed by staining with Coomassie Blue. The sizes of protein markers (M) are indicated to the left.

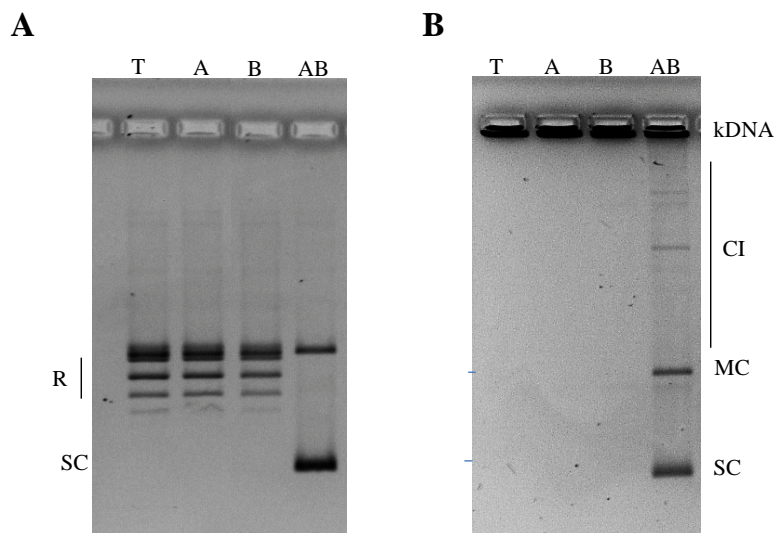


Figure S3. Absence of supercoiling and decatenation activities of the GyrA and GyrB subunits. **(A)** In the assay for DNA negative supercoiling activity, proteins were incubated with relaxed pHOT DNA plasmid as described in Material and Methods. Lane A, GyrA subunit (16 nM); lane B, GyrB subunit (16 nM); (lane AB), reconstituted DNA gyrase (8 nM); Lane T, relaxed pHOT DNA control. R, relaxed plasmid DNA; SC, supercoiled plasmid DNA. **(B)** In the assay for the decatenation activity, proteins were incubated with kDNA as described in Material and Methods. Lane A, GyrA subunit (16 nM); lane B, GyrB subunit (16 nM); (lane AB), reconstituted DNA gyrase (8 nM); Lane T, kDNA control. MC, minicircles, CI, catenated intermediates, SC, supercoiled minicircles.

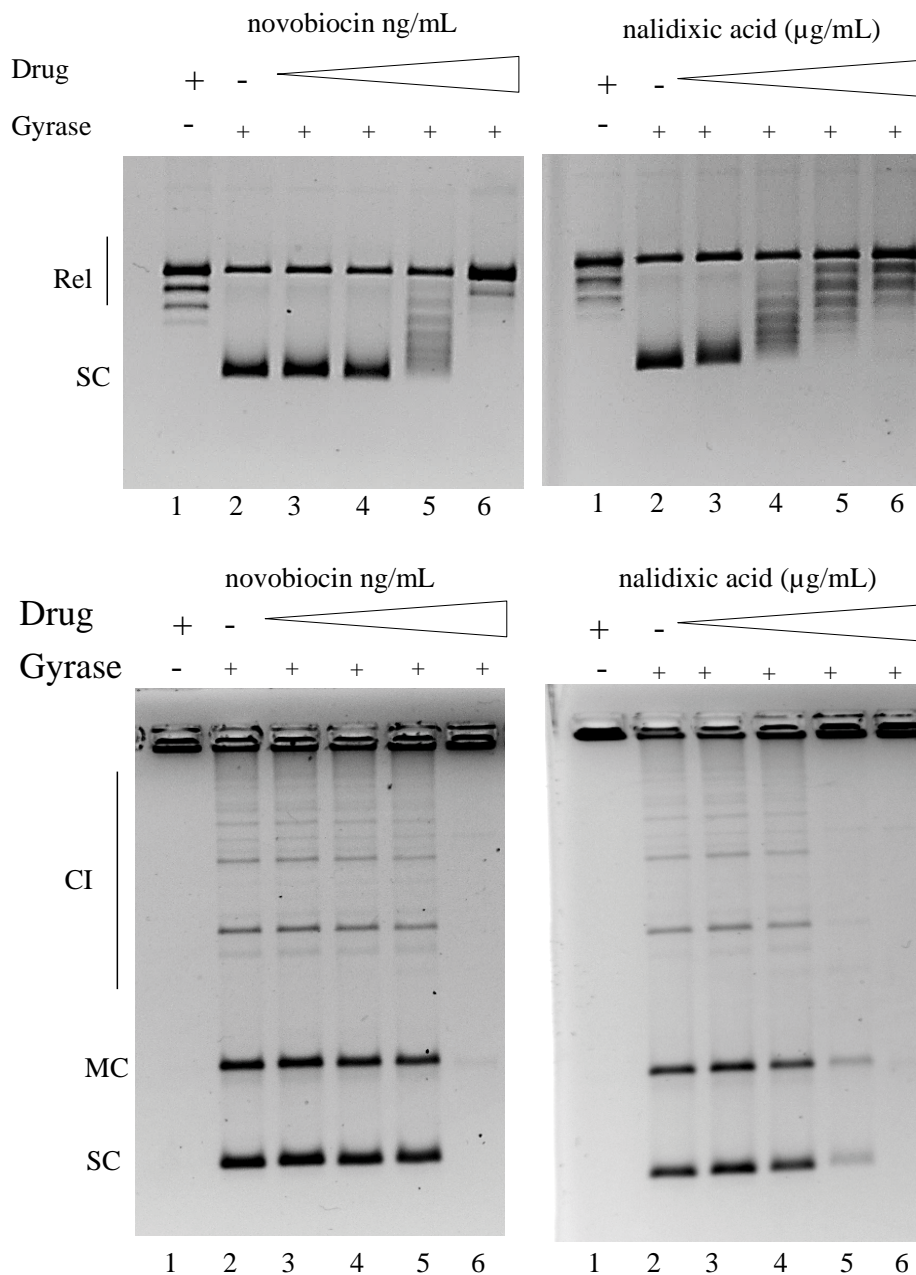


Figure S4: Effect of novobiocin and nalidixic acid on *D.radiodurans* gyrase activities. Assays of supercoiling activity (upper panels) and decatenation activity (lower panels) were carried out in the presence of 16 nM of DNA gyrase and increasing concentrations of novobiocin (left panels, lanes 2-6: 0, 0.16, 0.32, 0.64, 1.2 μg/mL, respectively) or nalidixic acid (right panels, lanes 2-6: 0, 0.16, 0.32, 0.64, 1.2 mg/mL, respectively). Lanes 1 represent the relaxed DNA control and the kDNA control incubated in the absence of DNA gyrase with the highest concentrations of drugs in the upper and lower panels, respectively.

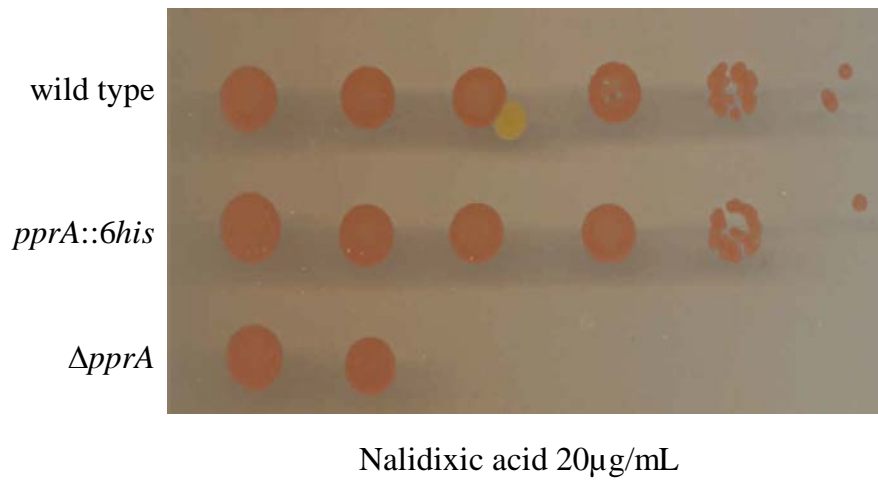


Figure S5: The tagged PprA::His6 protein is functional *in vivo*. Serial dilutions of bacterial cultures of wild type (GY9613), $\Delta pprA$ (GY14661) and *pprA::6His* (GY16179) strains were spotted on plate in the presence of nalidixic acid at 20μg/mL and the plate was incubated at 30°C for 5 days.

Table S1. List of identified proteins ranked by classes and fold changes.

Rep= Replicate

Accession	Functional annotation	Mass (Da)	Spectral count														Total SC sum	Mascot score	Comparison 1 (pprA-HA 3.8 kGy versus pprA-HA 0 kGy)		Comparison 2 (pprA-HA 3.8 kGy versus DpprA 3.8 kGy)			
			pprA-HA 3.8 kGy							pprA-HA 0 kGy									DpprA 3.8 kGy	DpprA 0 kGy	Fold Change	pValue	Fold Change	pValue
			Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep1								
Bait protein																								
DR_A0346	DNA damage repair protein	32190	130	63	86	84	100	17	10	8	11	0	0	0	0	0	0	0	509	1164	7.5	9.41E-17	93.6	8.09E-23
Proteins with fold change above 1.5 in Comparison 1 (pprA-HA 3.8 kGy versus pprA-HA 0 kGy) and above 1.5 in Comparison 2 (pprA-HA 3.8 kGy versus DpprA 3.8 kGy)																								
DR_Q309	Elongation factor Tu	44425	2	11	17	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32	470	7.2	1.95E-02	7.2	3.96E-02
DR_Q508	Hexagonally packed intermediate-layer surface protein	99295	24	18	21	0	11	0	0	0	0	4	9	2	0	0	0	94	691	7.0	4.97E-04	2.1	8.69E-02	
DR_Q193	DNA gyrase, subunitA	89769	0	11	2	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	273	4.8	6.90E-02	4.8	1.12E-01	
DR_Q983	30S ribosomal protein S1	69268	1	7	9	0	3	2	1	0	0	1	1	3	0	0	0	28	257	2.9	6.88E-02	2.5	2.40E-01	
DR_Q2070	Membrane lipoprotein	40242	0	5	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	139	3.0	1.99E-01	1.5	4.65E-01	
DR_Q1624	RNA helicase	60438	0	0	1	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	102	2.6	2.18E-01	2.6	2.90E-01	
DR_Q1955	Extracellular solute-binding protein	56546	0	5	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	162	2.4	2.48E-01	2.4	3.25E-01	
DR_Q0907	Chaperonin GroEL	57742	2	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	101	2.4	2.49E-01	2.4	3.25E-01	
DR_Q0906	DNA gyrase, subunitB	73113	0	1	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	65	2.0	3.27E-01	2.0	4.10E-01	
DR_Q363	Peptide ABC transporter, periplasmic peptide-binding protein, pI	64802	0	5	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	8	103	1.9	2.48E-01	2.4	3.25E-01	
DR_Q1185	S-layer-like array-related protein	36685	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	74	1.8	3.00E-01	1.8	3.73E-01	
Proteins with fold change below 1.5 in Comparison 1 (pprA-HA 3.8 kGy versus pprA-HA 0 kGy) and above 1.5 in Comparison 2 (pprA-HA 3.8 kGy versus DpprA 3.8 kGy)																								
DR_Q821	lipase, putative	49469	0	0	0	0	7	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	10	98	1.4	2.48E-01	2.4	3.25E-01	
DR_Q1192	hypothetical protein DR_1192	41118	8	3	2	0	11	9	3	0	4	2	2	10	2	0	0	56	211	1.2	3.06E-01	1.9	2.45E-01	
DR_Q1574	hypothetical protein DR_1574	24612	13	13	11	10	14	15	9	14	17	9	7	15	0	0	0	147	291	-1.1	2.27E-01	1.5	3.62E-01	
DR_Q0038	ribose transferase, putative	30948	17	15	21	7	28	28	18	14	26	18	16	21	0	0	0	229	630	-1.2	1.60E-01	1.0	2.88E-01	
DR_Q1745	hypothetical protein DR_1745	21354	6	6	4	0	5	7	3	5	7	4	3	4	0	0	0	54	111	-1.3	2.54E-01	1.2	3.95E-01	
DR_Q2109	ribosomal protein S14	12278	2	2	2	1	1	2	3	2	3	2	0	2	0	0	0	22	80	-1.3	2.29E-01	1.3	4.34E-01	
DR_Q317	30S ribosomal protein S3	27291	28	18	7	3	5	20	20	16	21	3	3	16	0	0	0	160	454	-1.5	7.96E-02	3.3	4.48E-02	
DR_Q1513	30S ribosomal protein S2	29737	27	39	24	7	17	33	35	35	40	21	5	21	2	0	0	306	744	-1.5	1.98E-02	1.7	1.52E-01	
DR_Q1077	chito oligosaccharide deacetylase	43841	11	4	9	0	17	16	15	7	15	3	0	11	0	0	0	108	304	-1.5	1.11E-01	3.7	4.42E-02	
DR_Q0037	glycosyltransferase	37664	0	2	2	0	1	2	2	2	3	1	0	2	0	0	0	17	50	-1.6	2.73E-01	1.3	4.10E-01	
DR_Q1590	hypothetical protein DR_1590	20875	1	6	3	2	3	8	2	6	6	3	1	4	0	0	0	45	116	-1.6	1.78E-01	1.3	5.04E-01	
DR_Q3006	30S ribosomal protein S7	17930	17	18	6	6	6	21	15	21	18	9	5	10	0	0	0	154	296	-1.6	5.24E-02	1.5	3.81E-01	
DR_Q2004	50S ribosomal protein L20	13949	6	5	2	2	5	7	8	8	6	2	4	4	0	0	0	59	155	-1.7	1.61E-01	1.3	5.96E-01	
DR_Q202	hypothetical protein DR_0202	20648	0	1	0	0	0	3	0	0	1	0	0	6	0	0	0	11	134	-1.7	2.99E-01	1.2	5.23E-01	
DR_Q1222	polysaccharide deacetylase, putative	25220	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	5	101	-1.8	2.85E-01	1.0	4.08E-01	
DR_Q0950	NADH dehydrogenase II	41262	0	1	0	0	1	2	0	2	2	2	2	0	0	0	0	8	53	-1.8	2.09E-01	1.4	4.70E-01	
DR_Q2514	hypothetical protein DR_2514	22278	4	4	2	0	5	7	4	7	8	2	2	4	0	0	0	49	174	-1.9	1.24E-01	1.3	5.04E-01	
DR_Q0629	cell division protein FtsQ-related protein	31447	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	53	-2.0	2.99E-01	1.0	4.08E-01	
DR_Q1392	hypothetical protein DR_1392	30944	3	2	0	0	0	4	0	2	8	0	0	4	0	0	0	23	193	-2.3	1.48E-01	2.0	4.10E-01	
DR_Q0175	30S ribosomal protein S9	14724	10	12	1	0	0	11	10	13	14	1	0	6	0	0	0	78	329	-2.3	2.64E-02	3.7	8.04E-02	
DR_Q0101	30S ribosomal protein S18	10617	2	3	0	0	0	0	5	2	5	3	0	0	0	0	0	20	104	-2.4	1.24E-01	2.0	4.10E-01	
DR_Q1225	30S ribosomal protein S13	14219	6	6	0	0	0	0	11	3	6	9	0	2	0	0	0	43	181	-2.4	5.39E-02	3.4	2.17E-01	
DR_Q2113	30S ribosomal protein S5	20964	0	5	0	0	0	0	6	4	7	1	0	2	0	0	0	29	221	-3.1	6.78E-02	1.3	4.10E-01	
Proteins with fold change below 1.5 in Comparison 2 (pprA-HA 3.8 kGy versus DpprA 3.8 kGy)																								
DR_Q1571	peptide ABC transporter, periplasmic peptide-binding protein	65579	23	51	52	6	37	21	20	29	5	25	22	15	6	0	0	312	1092	1.8	1.62E-02	1.4	2.27E-01	
DR_Q2184	hypothetical protein DR_2184	46429	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	82	1.4	3.92E-01	1.4	4.70E-01	
DR_Q0008	hypothetical protein DR_0008	37073	12	25	13	6	10	14	15	7	9	12	9	0	0	0	0	150	482	1.3	1.87E-01	1.4	2.84E-01	
DR_Q0060	hypothetical protein DR_A0060	37058	16	14	13	6	12	7	4	4	5	10	9	6	0	0	0	106	322	2.2	5.94E-02	1.3	4.25E-01	
DR_Q2478	hypothetical protein DR_2478	45164	9	6	9	3	19	8	7	5	9	8	9	7	0	0	0	99	289	1.2	3.09E-01	1.1	3.13E-01	
DR_Q0229	hypothetical protein DR_A0229	29085	0	5	5	0	4	3	4	3	4	5	4	3	0	0	0	129	132	-1.3	2.36E-01	-1.8	5.21E-02	
DR_Q2549	epoxide hydrolase-related protein	31343	1	2	3	0	3	0	0	3	2	5	5	2	0	0	0	29	63	-1.1	3.26E-01	-2.1	4.29E-02	
DR_Q1022	hypothetical protein DR_1022	36800	0	6	0	0	0	5	2	3	2	10	6	2	0	0	0	36	240	-1.8	2.12E-01	-4.1	6.31E-03	
DR_Q0161	hypothetical protein DR_0161	34867	21	45	48	24	49	54	54	66	56	48	47	46	9	0	0	567	1293	-1.5	9.26E-03	-1.3	8.62E-03	
DR_Q2250	methoxyneurosporene dehydrogenase	52622	46	51	65	30	76	59	51	57	47	69	74	55	21	0	0	701	1298	1.0	3.07E-01	-1.3	9.21E-04	

DR_0626	UDP-N-acetylglucosamine-N-acetylmuramyl-(pentapeptide)pyr	44080	30	22	30	15	37	38	39	40	33	38	43	27	13	405	775	-1,4	4,62E-02	-1,5	2,19E-03
DR_1326	carboxymethylglucosaminidase-related protein	31161	17	16	16	12	22	22	19	19	19	22	13	16	0	213	378	-1,2	1,61E-01	-1,1	1,20E-01
DR_0353	ribonuclease	84689	0	3	4	0	2	1	1	2	0	2	2	0	1	18	95	1,4	3,02E-01	-1,1	2,37E-01
DR_2550	hypothetical protein DR_2550	25242	0	2	0	0	0	3	0	2	1	1	0	0	0	9	36	-1,8	2,08E-01	-1,1	2,70E-01
DR_0910	cell wall protein, putative	69793	0	0	1	1	7	3	5	6	3	1	3	0	0	30	166	-1,9	1,11E-01	-1,1	2,37E-01
DR_2087	initiation factor 3	23602	0	4	2	3	4	4	2	4	3	2	4	3	0	35	88	-1,2	2,87E-01	-1,1	2,39E-01
DR_1888	hypothetical protein DR_1888	22116	9	16	11	1	11	14	14	13	18	11	11	8	0	137	355	Not considered	Not considered	-1,1	1,55E-01
DR_2527	hypothetical protein DR_2527	20312	0	3	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	9	181	2,2	2,88E-01	-1,1	2,56E-01
DR_1245	hypothetical protein DR_1245	18891	0	5	4	0	0	0	0	0	0	5	0	0	14	176	2,8	1,90E-01	-1,3	1,57E-01	
DR_0444	lipopolysaccharide biosynthesis protein, putative	42345	0	4	10	0	3	3	4	5	2	7	3	3	0	44	303	-1,0	3,34E-01	-1,4	1,54E-01
DR_0958	peptide ABC transporter, permease protein	35970	0	4	2	0	1	4	4	6	4	3	2	1	0	31	135	-2,3	9,29E-02	-1,5	1,57E-01
DR_0916	RNA polymerase sigma-A factor	41495	4	10	6	2	10	10	8	10	9	10	10	9	0	98	269	-1,4	1,81E-01	Not considered	Not considered
DR_2417m	hypothetical protein DR_2417m	63624	0	2	1	0	2	2	2	2	0	0	0	0	0	11	37	-1,3	3,38E-01	2,0	4,10E-01
DR_1080	hypothetical protein DR_1080	23682	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	25	1,8	3,00E-01	1,8	3,73E-01
DR_1343	glycerol dehydro-3-phosphate dehydrogenase	35690	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	70	1,8	3,00E-01	1,8	3,73E-01
DR_2340	recombinase A	38121	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	39	18	3,00E-01	3,00E-01	1,8	3,73E-01
DR_80033	ayl esterase/monooxygenase	91524	2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	4	57	-1,1	3,40E-01	1,4	4,70E-01
DR_0156	riboflavin synthase, beta subunit	16606	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	17	1,4	3,92E-01	1,4	4,70E-01	
DR_0732	hisF protein	28187	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	1,4	3,92E-01	1,4	4,70E-01	
DR_0755	50S ribosomal protein L19	18305	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	1,4	3,92E-01	1,4	4,70E-01	
DR_1655	ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein, putative	35468	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	1,4	3,92E-01	1,4	4,70E-01	
DR_0247	holo-acyl carrier protein synthase, putative	15105	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	19	1,4	3,92E-01	1,4	4,70E-01	
DR_80010	cobalamin biosynthesis protein CobD, putative	31806	1	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	4	34	-1,5	2,85E-01	1,2	5,23E-01
DR_A0033	ExoP-related protein	61933	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	3	60	-1,3	3,40E-01	1,2	5,23E-01
DR_1038	peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase, cyclophilin-type	21308	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28	1,2	4,49E-01	1,2	5,23E-01	
DR_1039	branched-chain amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid	40941	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	30	1,2	4,49E-01	1,2	5,23E-01
DR_0237	DNA mismatch repair protein MutS	25327	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	1,2	4,49E-01	1,2	5,23E-01	
DR_1724	hypothetical protein DR_1724	47040	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	18	1,2	4,49E-01	1,2	5,23E-01
DR_1771	exonuclease ABC, subunit A	112030	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	45	1,2	4,49E-01	1,2	5,23E-01
DR_2052	ABC transporter ATP-binding protein	68772	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	1,2	4,49E-01	1,2	5,23E-01	
DR_2271	hypothetical protein DR_2271	74123	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	1,2	4,49E-01	1,2	5,23E-01	
DR_2453	cation-transporting ATPase	88117	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	19	1,2	4,49E-01	1,2	5,23E-01
DR_2594	magnesium protoporphyrin chelatase, putative	53196	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	1,2	4,49E-01	1,2	5,23E-01	
DR_A0014	adenylyl sulfatase kinase	20576	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	1,2	4,49E-01	1,2	5,23E-01	
DR_A0075	transposase, putative	78255	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	1,2	4,49E-01	1,2	5,23E-01	
DR_1309	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	131035	0	2	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	6	30	1,1	3,43E-01	1,1	3,46E-01
DR_2150	30S ribosomal protein S20	9997	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	88	-2,3	2,50E-01	1,0	4,08E-01
DR_0314	hypothetical protein DR_2150	10621	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	3	21	-1,8	2,88E-01	1,0	4,08E-01
DR_1985	50S ribosomal protein L2	30026	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	42	42	-1,5	3,40E-01	1,0	4,08E-01
DR_0535	beta-lactamase, putative	46664	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2	58	-1,5	3,40E-01	1,0	4,08E-01
DR_0132	hypothetical protein DR_0132	30484	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	24	-1,3	4,07E-01	1,0	4,08E-01
DR_0744	hypothetical protein DR_0535	90864	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	40	-1,3	4,07E-01	1,0	4,08E-01
DR_0814	sensory histidine kinase	61898	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	16	-1,3	4,07E-01	1,0	4,08E-01
DR_0911	proline dehydrogenase, putative	34905	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	17	1,0	4,86E-01	1,0	4,08E-01
DR_1145	DNA-directed RNA polymerase, beta subunit	171882	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16	1,0	4,86E-01	1,0	4,08E-01
DR_2295	GTP-binding protein LepA	66995	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16	1,0	4,86E-01	1,0	4,08E-01
DR_1417	amino transferase, class V	42534	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	48	-1,3	4,07E-01	1,0	4,08E-01
DR_A0222	hypothetical protein DR_2295	15225	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	57	-1,3	4,07E-01	1,0	4,08E-01
DR_0762	TDP-glucose-4,6-dehydratase-related protein	31634	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	18	-1,3	4,07E-01	1,0	4,08E-01
DR_1462	penicillin-binding protein 1B, MCR, putative	111097	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	82	1,2	4,49E-01	-1,3	2,70E-01
DR_1692	hypothetical protein DR_0762	14763	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	29	1,0	4,86E-01	-1,5	2,70E-01
DR_80097	long-chain fatty acid--CoA ligase	148255	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	1,0	4,86E-01	-1,5	2,70E-01	
DR_A0194	hypothetical protein	36549	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	32	1,0	4,86E-01	-1,5	2,70E-01
DR_0095	hypothetical protein DR_A0194	42503	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	18	-1,8	2,88E-01	-2,0	2,26E-01
DR_0184	ABC transporter, ATP-binding protein	66045	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	2	39	1,0	4,86E-01	-2,0	2,26E-01
DR_0184	enoyl-CoA hydratase	29207	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	0	6	35	1,2	4,49E-01	-2,1	1,50E-01

Proteins not identified with at least two different peptide sequences

Chapitre 3 :

La délétion de *recN* supprime le phénotype sensible de la délétion *pprA* aux agents endommageant l'ADN testés

Présentation de la problématique

Mes travaux de thèse suggèrent un rôle mineur de la protéine PprA dans la réparation des cassures de l'ADN et un rôle important dans la ségrégation des chromosomes après irradiation. En effet, après réparation des cassures double brin de l'ADN engendrées par l'exposition au rayonnement ionisant, les défauts majeurs observés dans la division cellulaire et l'absence de séparation complète de l'ADN entre cellules filles dans les bactéries dépourvues de la protéine PprA (Devigne *et al.*, 2013), la localisation de PprA en travers du septum dans des bactéries sauvages (Devigne *et al.*, 2013), l'interaction physique de la protéine PprA avec l'ADN gyrase et sa capacité de stimuler l'activité de décaténation de l'ADN gyrase (Devigne *et al.*, 2015a) suggèrent une implication de la protéine PprA dans la ségrégation des chromosomes après irradiation, une fois que la réparation de l'ADN a été effectuée.

Chez *E. coli* et *B. subtilis*, les complexes MukBEF et SMC-ScpA-ScpB, jouent un rôle important dans la ségrégation des chromosomes en absence d'irradiation, l'absence d'une protéine de ces complexes augmentant le nombre de cellules anucléées dans les cultures. Chez *D. radiodurans*, l'absence de la protéine SMC n'engendre aucun défaut de ségrégation des chromosomes ni aucune radiosensibilisation des cellules. Par contre, les bactéries dépourvues de la protéine SMC se sont révélées plus sensibles à l'acide nalidixique et à la novobiocine que les bactéries sauvages (Bouthier de la Tour *et al.*, 2009). Le même phénotype de sensibilité aux inhibiteurs de gyrase a été observé en absence d'un autre complexe qui contient une protéine SMC-like, le complexe SbcCD et les effets des délétions Δsmc et $\Delta sbcCD$ sont cumulatifs (Bouthier de la Tour *et al.*, 2009). Nous avons donc décidé de nous intéresser au phénotype des doubles mutants dépourvus de la protéine PprA et d'une protéine de la famille SMC ou SMC-like.

Résultats et discussion

(1) L'absence de la protéine RecN supprime la radiosensibilité des mutants $\Delta pprA$

Afin d'étudier les possibles interactions génétiques entre PprA et les protéines de la famille SMC chez *D. radiodurans*, des doubles mutants $\Delta pprA \Delta smc$, $\Delta pprA \Delta sbcC$ et $\Delta pprA \Delta recN$ ont été construits en introduisant respectivement la délétion $\Delta smc\Omega cat$, la délétion $\Delta sbcC\Omega kan$ ou la délétion $\Delta recN\Omega kan$ dans un simple mutant $\Delta pprA$. Après 3 cycles de purification sur milieu sélectif, la structure génétique des souches et la pureté des allèles introduits ont été vérifiées par PCR (Figure 1).

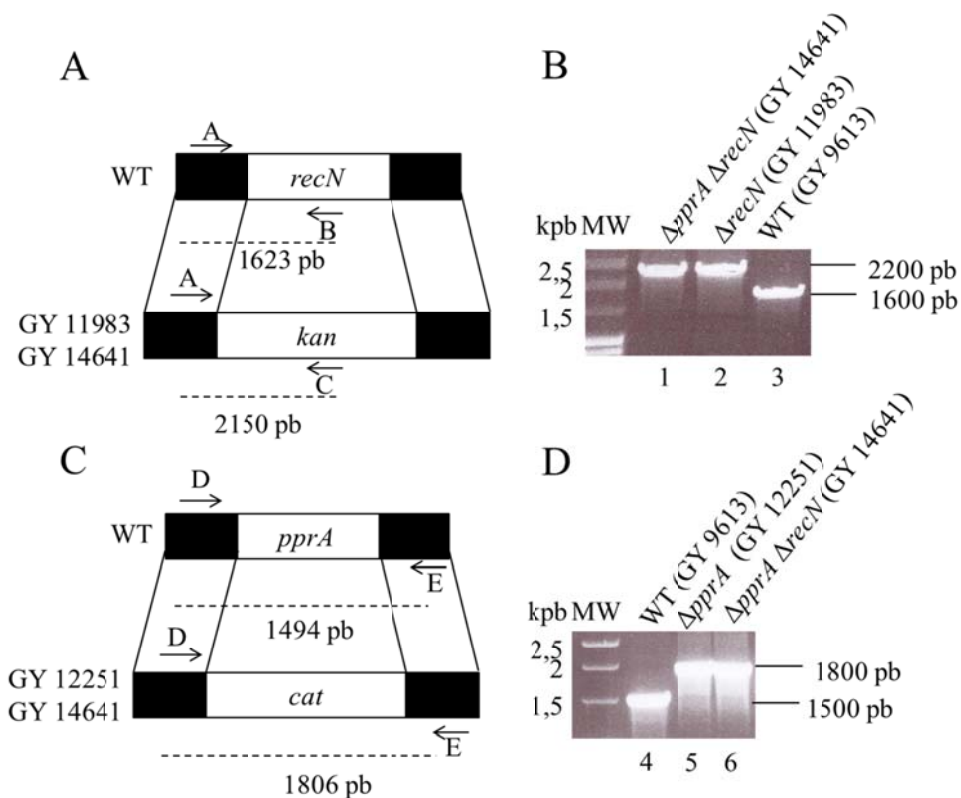


Figure 1 : Représentation schématique et vérification des homogénéisations pour les souches $\Delta recN$, $\Delta pprA$ et $\Delta pprA \Delta recN$. (A) Représentation schématique du remplacement allélique du gène *recN*. Les tailles des 2 gènes *recN* et *kan* étant approximativement les mêmes, les réactions des PCR ont été réalisées avec 3 oligonucléotides produisant des tailles de produits d'amplification différentes dans le cas des 2 contextes génétiques. (B) Analyses du mutant $\Delta pprA \Delta recN$, les tailles attendues des fragments amplifiés par PCR pour les témoins, sauvage (WT) et $\Delta recN$, sont données à droite du gel. Les PCR numérotées de 1 à 3 ont été réalisées avec les 3 oligonucléotides A, B et C. (C) Représentation schématique du remplacement allélique du gène *pprA*. (D) Analyses du mutant $\Delta pprA \Delta recN$. Les tailles attendues des fragments amplifiés par PCR pour les témoins, sauvage (WT) et $\Delta pprA$ sont

données à droite du gel. Les PCR numérotées de 4 à 6 ont été réalisées avec les oligonucléotides D et E.

Les souches simple et double mutantes ont ensuite été testées pour leur sensibilité aux rayonnements γ (**Figure 2**).

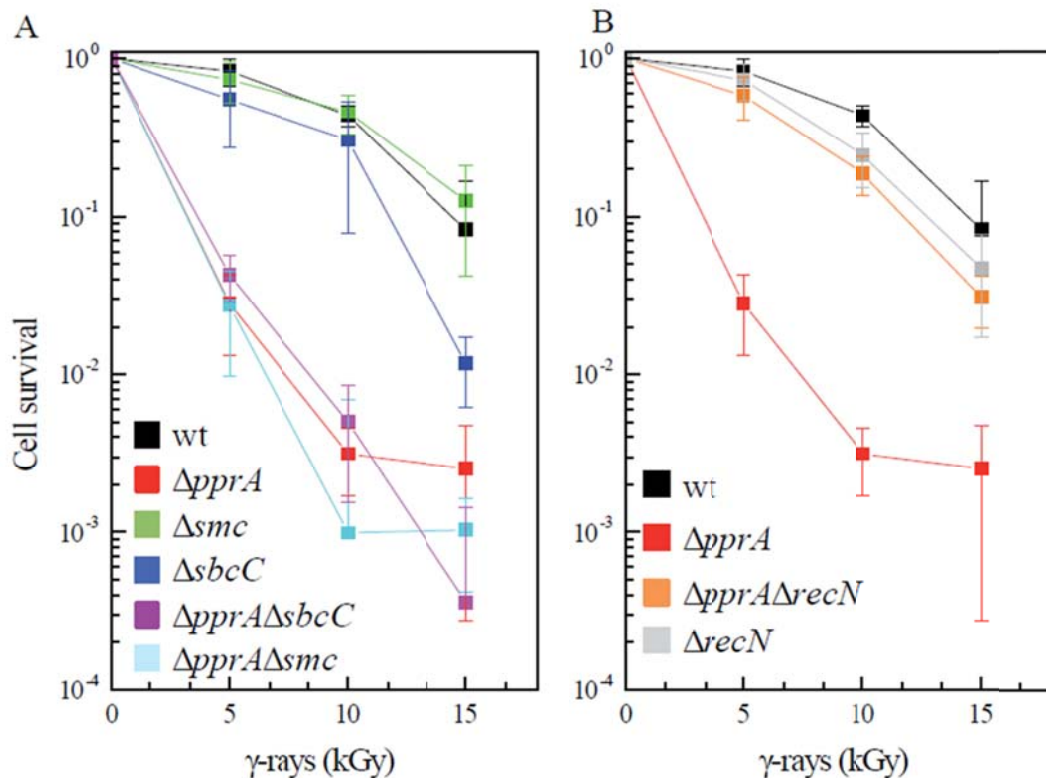


Figure 2 : Courbe de survie des souches de *D. radiodurans* (A) sauvage (WT), simples mutants $\Delta pprA$, Δsmc , $\Delta sbcC$ et doubles mutantes $\Delta pprA \Delta smc$ et $\Delta pprA \Delta sbcC$ et (B) sauvage, simples mutants $\Delta pprA$, $\Delta recN$ et doubles mutantes $\Delta pprA \Delta recN$. Des dilutions adéquates des cultures non irradiées ou exposées à différentes doses de rayonnements γ ont été étalées sur milieu gélosé sans antibiotique puis incubées à 30°C pendant 3 jours avant de compter les colonies. Ces expériences ont été réalisées au moins 3 fois de manière indépendante.

Le simple mutant Δsmc est aussi résistant aux rayonnements γ que la souche sauvage, ce qui avait déjà été montré dans Bouthier *et al.* (Bouthier de la Tour *et al.*, 2009), le simple mutant $\Delta sbcC$ est 10 fois plus sensible que la souche sauvage lorsqu'il est exposé à une dose de 15 kGy, ce qui est conforme aux résultats obtenus par Bentchikou *et al.* (Bentchikou *et al.*, 2007) par contre nous n'avons pas retrouvé les résultats publiés par Funayama *et al.* (Funayama *et al.*, 1999) qui montraient qu'un mutant $\Delta recN$ présentait une sensibilité accrue aux rayonnements γ (environ 5% de survie à 8 kGy), le mutant $\Delta recN$ que nous avons

construit étant presque aussi radiorésistant que la souche sauvage. La souche *ΔpprA* est comme attendue 100 fois plus sensible aux rayonnements γ que la souche sauvage et les double mutants *ΔpprA Δsmc* et *ΔpprA ΔsbcC* se comportent comme un simple mutant *ΔpprA*. Par contre, de façon très étonnante, la délétion du gène *recN* supprime totalement la radiosensibilité du mutant *ΔpprA* suggérant que la présence de la protéine RecN va engager les cellules dans une voie qui va nécessiter la présence de la protéine PprA pour survivre. Ceci est d'autant plus étonnant que la protéine PprA semble jouer un rôle mineur dans la réparation des cassures double brin de l'ADN et serait impliquée dans la ségrégation des chromosomes, probablement en favorisant le recrutement de l'ADN gyrase et en stimulant son activité décaténase (Devigne *et al.*, 2015a).

(2) L'absence de RecN supprime la sensibilité aux inhibiteurs de l'ADN gyrase des mutants *ΔpprA*

Une équipe indienne et notre laboratoire ont montré précédemment que les mutants *ΔpprA* sont hypersensibles à l'acide nalidixique et à la novobiocine [(Kota *et al.*, 2014b, Devigne *et al.*, 2015a) et **Figure 3**]. Notre laboratoire a également montré que les mutants *ΔsbcC* et *Δsmc* présentent une sensibilité accrue en présence de 40 $\mu\text{g/mL}$ d'acide nalidixique ou 20 ng/mL de novobiocine avec un phénotype exacerbé dans le double mutant *ΔsbcC Δsmc* (Bouthier de la Tour *et al.*, 2009). Cette hypersensibilité aux inhibiteurs de gyrase des mutants dépourvus de SMC ou MukB a également été observée respectivement chez *B. subtilis* (Lindow *et al.*, 2002) et *E. coli* (Onogi *et al.*, 2000, Adachi & Hiraga, 2003). Ici nous montrons que l'hypersensibilité des mutants *ΔpprA* cultivés sur milieu gélosé contenant 20 $\mu\text{g/mL}$ d'acide nalidixique ou 5 ng/mL de novobiocine est exacerbée en absence de SMC ou de SbcC (**Figure 3**). De même, nous ne voyons aucun effet aux doses utilisées de l'absence de RecN dans une souche *pprA*⁺ sur la sensibilité aux inhibiteurs de gyrase. Par contre, aux doses utilisées, l'absence de RecN supprime totalement la sensibilité des mutants *ΔpprA* aux inhibiteurs de gyrase (**Figure 3**, **Figure 4**).

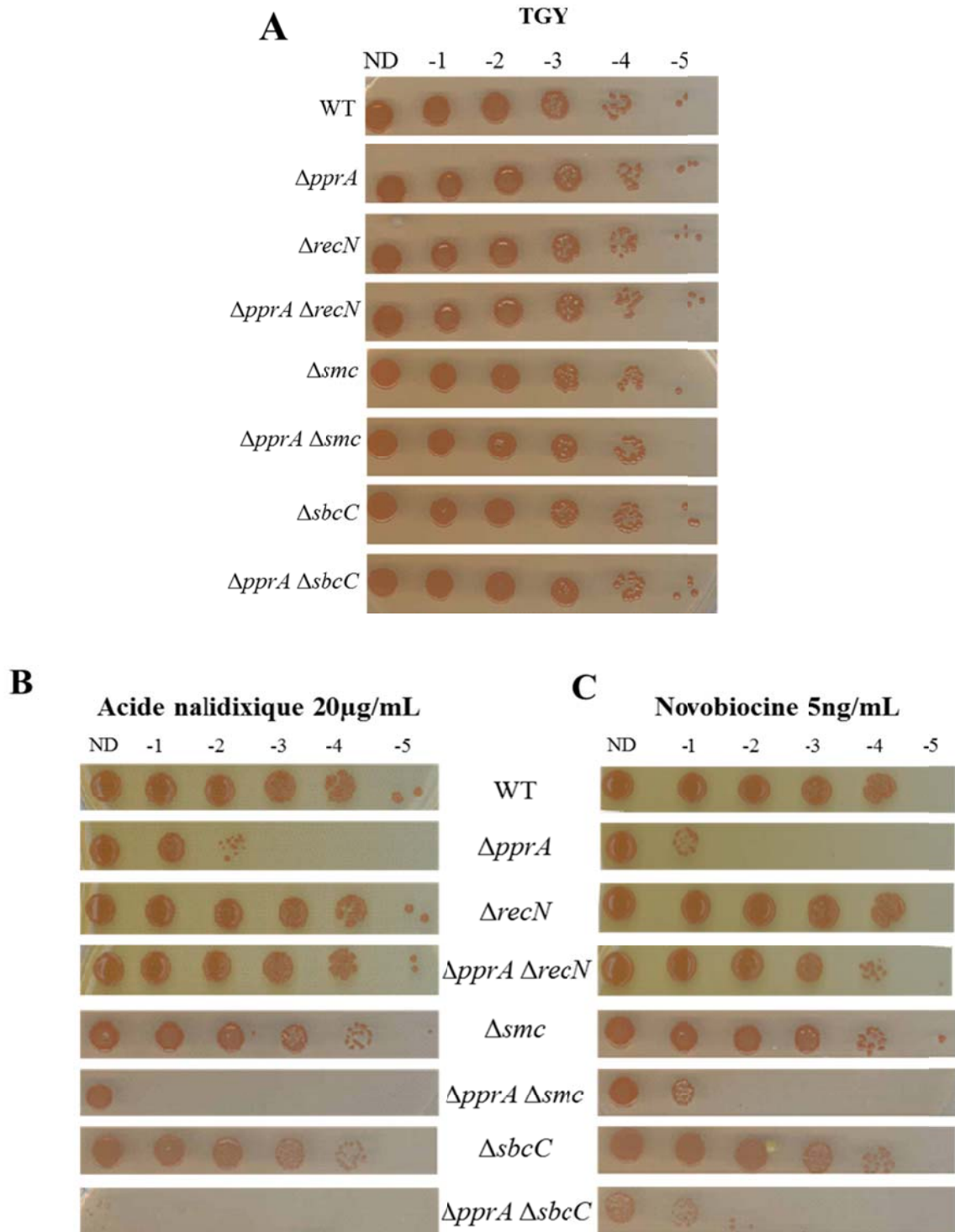


Figure 3 : Test de sensibilité aux inhibiteurs de l'ADN gyrase (A) TGY agar, (B) TGY agar + acide nalidixique 20 μg/mL, (C) TGY + novobiocine 5ng/mL, pour les souches $\Delta pprA$ Δsmc , $\Delta pprA \Delta sbcC$, $\Delta pprA \Delta recN$, Δsmc , $\Delta sbcC$, $\Delta recN$, $\Delta pprA$ et sauvage de *D.*

radiodurans. 3 μ L des dilutions sérielles des cultures ont été déposées sur milieu TGY agar contenant ou non de l'acide nalidixique ou de la novobiocine aux doses indiquées.

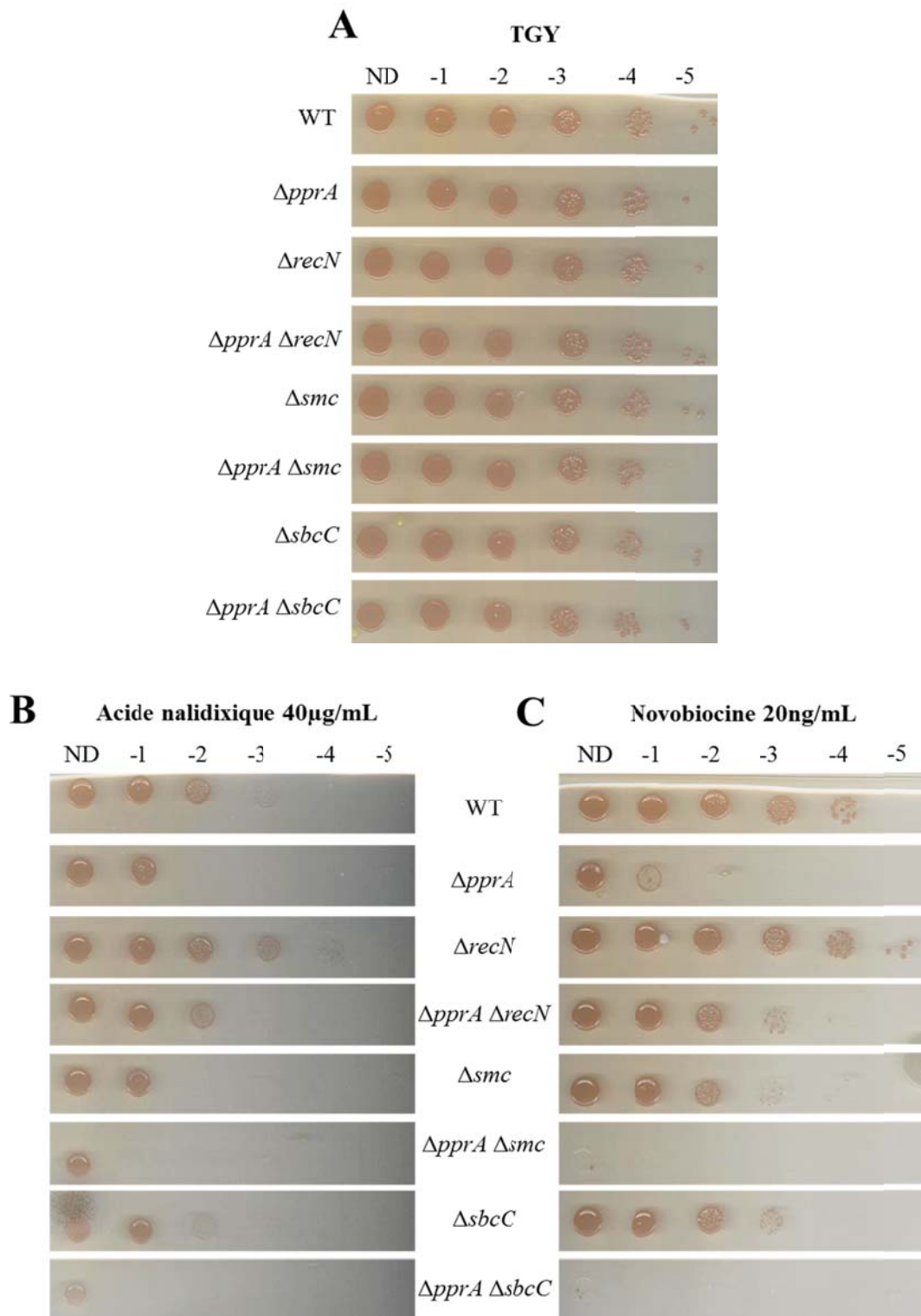


Figure 4 : Test de sensibilité aux inhibiteurs de l'ADN gyrase (A) TGY, (B) TGY + acide nalidixique 40 μ g/mL, (C) TGY + novobiocine 20ng/mL, pour les souches $\Delta pprA \Delta smc$, $\Delta pprA \Delta sbcC$, $\Delta pprA \Delta recN$, Δsmc , $\Delta sbcC$, $\Delta recN$, $\Delta pprA$ et sauvage de *D. radiodurans*.

3 μ L des dilutions sérielles des cultures ont été déposées sur milieu TGY agar contenant ou non de l'acide nalidixique ou de la novobiocine aux doses indiquées.

Ces résultats ouvrent de nombreuses questions sur les causes de la sensibilité des mutants $\Delta pprA$, Δsmc ou $\Delta sbcC$ aux inhibiteurs de gyrase et sur la synergie entre ces mutations, les doubles mutants étant beaucoup plus sensibles que les simples mutants aux inhibiteurs de gyrase. Il avait été suggéré que les protéines de la famille SMC pourraient réguler l'activité de l'ADN gyrase soit en interagissant directement avec elle, soit en favorisant son recrutement sur l'ADN. Du fait de l'activité condensine des protéines SMC bactériennes, SMC pourrait aussi agir avec l'ADN gyrase pour maintenir un certain niveau de surenroulement ou de compaction de l'ADN (Sawitzke & Austin, 2000). L'absence de SMC pourrait en diminuant le surenroulement être plus sensible aux agents qui en inhibant la gyrase diminuent ce surenroulement. L'inhibition de la gyrase a des conséquences diverses dans la cellule (diminution du surenroulement, absence de suppression des supertours positifs générés lors de la réplication ou de la transcription, cassures double brin de l'ADN). SbcC pourrait être nécessaire pour la réparation de ces cassures, en particulier pour enlever l'ADN gyrase fixée de façon covalente sur les extrémités comme cela a été proposé pour le complexe SbcCD chez *E. coli* (Connelly & Leach, 2002, Cromie & Leach, 2001, Mascarenhas *et al.*, 2006). Il a été montré qu'une souche dépourvue de PprA a un taux de croissance identique à celui d'une souche sauvage et ne présente pas d'anomalie morphologique ni de défaut dans la ségrégation des chromosomes. Nous avons montré précédemment que le traitement par la novobiocine induit la réponse RDR (Devigne *et al.*, 2015a) connue pour être induite après irradiation γ ou dessiccation (Tanaka *et al.*, 2004, Ludanyi *et al.*, 2014, Devigne *et al.*, 2015b). Le signal qui induit cette réponse reste à élucider. Par contre, en absence de PprA, le traitement par la novobiocine induit les mêmes anomalies au niveau de la ségrégation des chromosomes que l'exposition au rayonnement γ dans les cellules dépourvues de PprA (Devigne *et al.*, 2015a). Les protéines SMC, SbcC et PprA pourraient donc chacune à leur niveau et par des mécanismes complètement différents jouer un rôle important dans la résistance aux inhibiteurs de gyrase.

Peu de choses sont connues sur la protéine RecN et son rôle dans la réparation de l'ADN chez les bactéries. Chez *D. radiodurans*, nous n'avons pas observé de sensibilité accrue aux radiations ionisantes ni aux inhibiteurs de gyrase chez le mutant $\Delta recN$. Le phénotype le plus surprenant est la suppression en absence de RecN de la sensibilité des mutants $\Delta pprA$ aux rayonnements γ et aux inhibiteurs de gyrase, suggérant un rôle direct ou indirect de ces deux

protéines dans la ségrégation des chromosomes après irradiation, une autre voie étant possible si ces deux protéines sont absentes. Ceci suggère aussi que RecN agirait probablement en amont de PprA.

(3) La réparation des cassures double brin de l'ADN est retardée dans les bactéries dépourvues de RecN et/ou de PprA

La cinétique de réparation des cassures de l'ADN dans les bactéries dépourvues de PprA montrait un retard de 30 minutes à 1 heure en comparaison de la souche sauvage lorsqu'elles sont exposées à une dose d'irradiation γ de 3,8 kGy (Devigne *et al.*, 2013). Ce retard observé est faible compte tenu de la grande radiosensibilité de la souche à cette dose d'irradiation, moins de 10% des cellules $\Delta pprA$ survivant à cette dose. Nous avons montré que les cellules dépourvues de PprA et de RecN sont aussi radiorésistantes qu'une souche sauvage et nous avons donc voulu tester si l'absence de RecN supprimait ce retard dans la réparation des cassures double brin de l'ADN chez un double mutant $\Delta pprA \Delta recN$. Les bactéries sauvages, $\Delta pprA$, $\Delta recN$ et $\Delta pprA \Delta recN$ ont été exposées à une dose d'irradiation γ de 5 kGy et la réparation des cassures double brin de l'ADN a été suivie à différents temps après irradiation par électrophorèse en champ pulsé. Pour les 4 souches irradiées, on constate immédiatement après irradiation (0 heure après irradiation) que l'ADN est complètement fragmenté en morceaux d'environ 50 kb (**Figure 5**). Nos résultats montrent qu'un mutant $\Delta recN$, bien qu'aussi radiorésistant qu'une souche sauvage, présente un retard d'une heure dans la réparation des cassures double brin de l'ADN ; on retrouve également un retard d'un peu plus d'une heure dans la réparation des cassures chez un mutant dépourvu de PprA. De façon intéressante, il semble qu'un double mutant $\Delta pprA \Delta recN$ répare les cassures double brin de l'ADN un peu plus rapidement qu'un mutant $\Delta pprA$ mais on ne retrouve pas pour autant une cinétique de réparation des cassures de l'ADN identique à celle observée chez une souche sauvage, un retard équivalent à celui observé dans une souche $\Delta recN$ étant toujours visible. Pour avoir des résultats plus précis, il faudra refaire ces cinétiques de réparation des cassures en faisant des prélèvements toutes les demi-heures entre 3 et 6h après irradiation. Il serait également intéressant pour accentuer les différences dans les cinétiques de réparation des cassures d'exposer les bactéries à des doses supérieures d'irradiation (7.5 kGy par exemple).

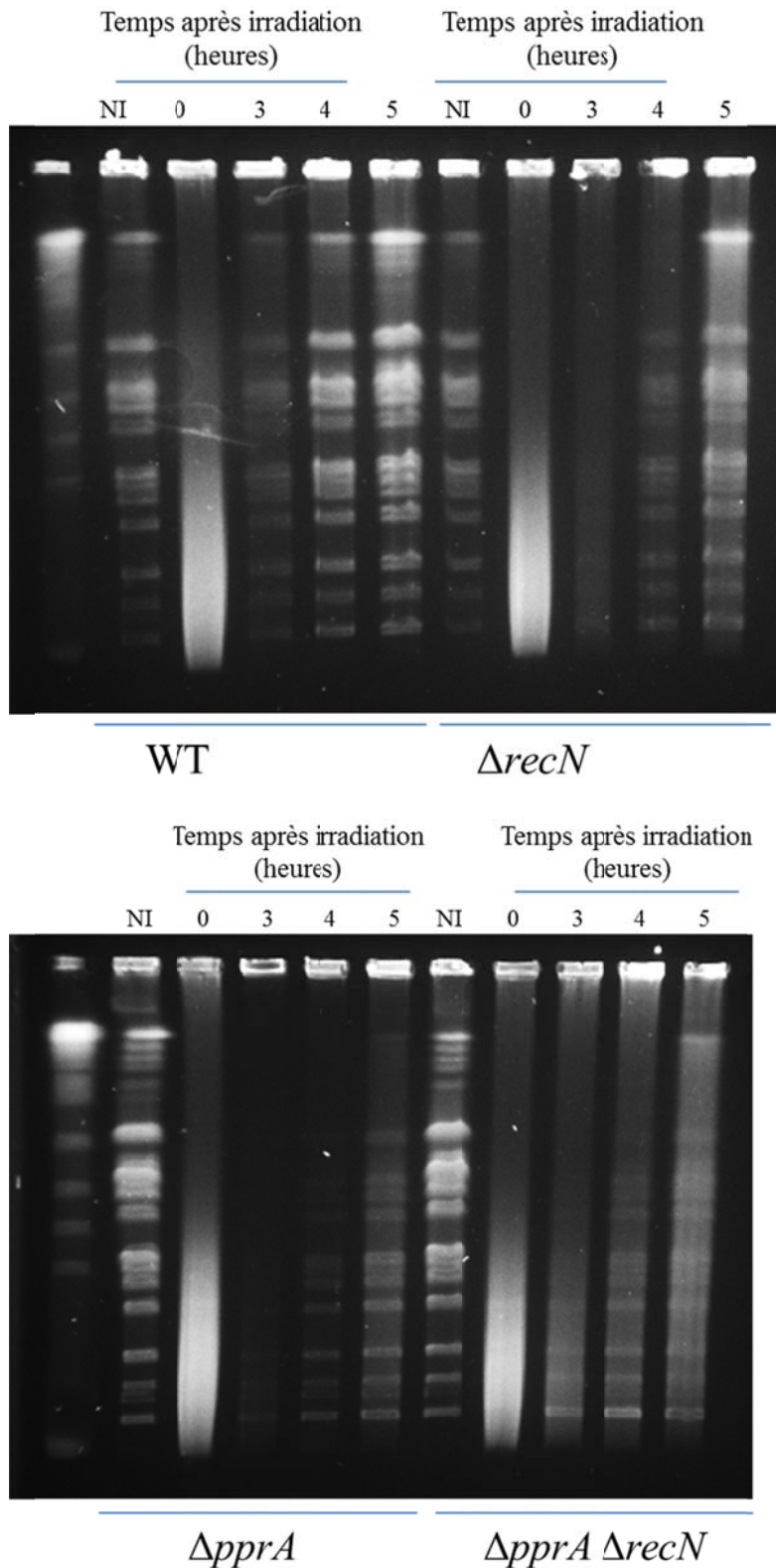
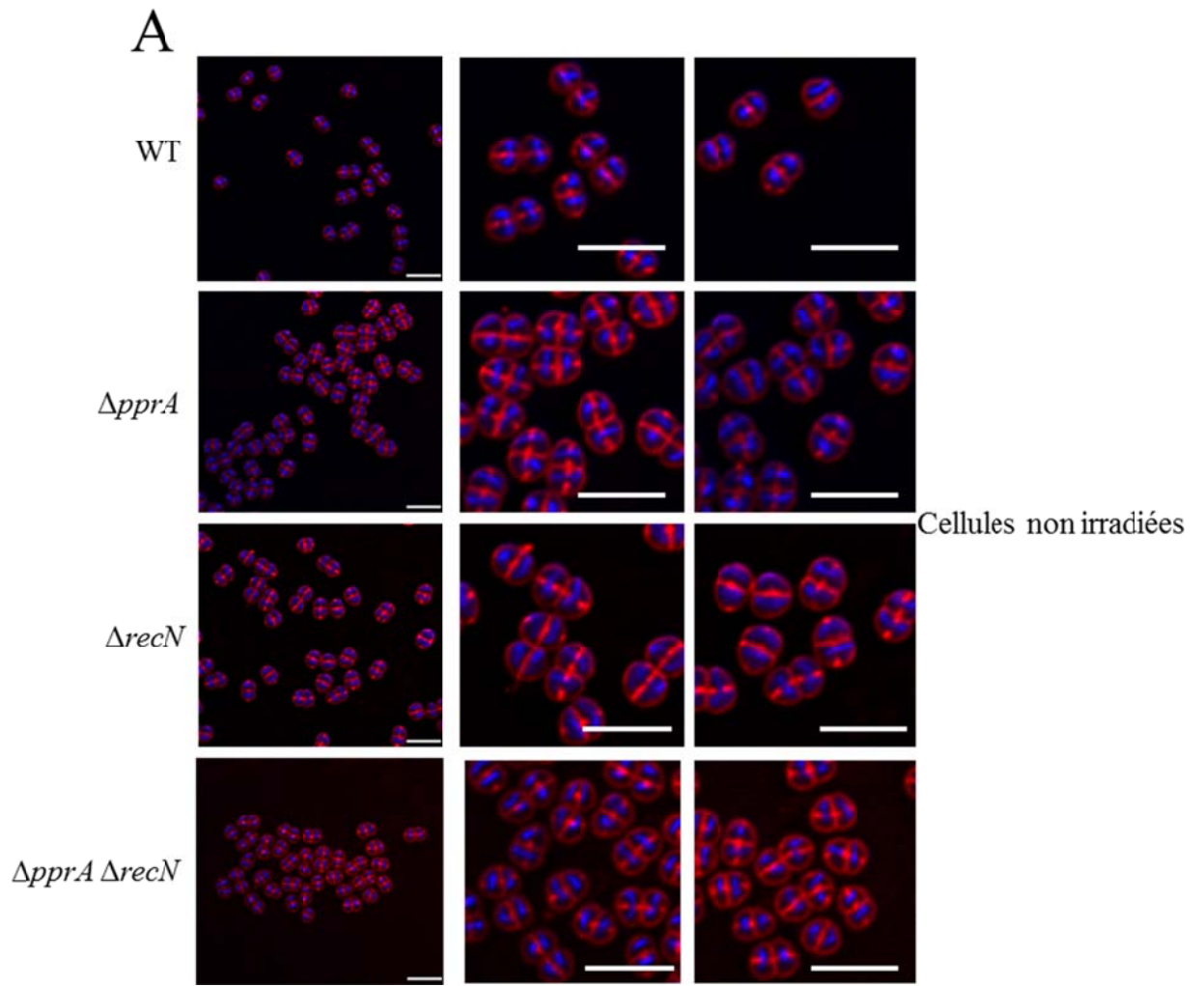


Figure 5 : Cinétique de réparation des cassures double brin de l'ADN dans les souches $\Delta recN$, $\Delta pprA$, $\Delta pprA \Delta recN$ et sauvage de *D. radiodurans*. Les cellules ont été exposées à une dose d'irradiation de 5 kGy puis remises en culture et des prélèvements ont été effectués à différents temps d'incubation post-irradiation. L'ADN a été purifié et digéré par l'enzyme de restriction *NotI* avant de migrer sur un gel d'électrophorèse à champ pulsé.

(4) Le double mutant $\Delta pprA \Delta recN$ présente une morphologie similaire au simple mutant $\Delta recN$ après irradiation.

Le mutant $\Delta pprA$ se caractérise par d'importantes anomalies dans la morphologie des cellules et la ségrégation des chromosomes après que l'ADN soit réparé après irradiation et il a été proposé que ce défaut soit responsable de l'hypersensibilité aux radiations des mutants $\Delta pprA$ (Devigne *et al.*, 2013). Les bactéries doubles mutantes $\Delta pprA \Delta recN$ étant aussi résistantes aux radiations qu'une souche $\Delta recN$ (**Figure 2 B**), nous avons donc décidé d'observer leur morphologie à différents temps après exposition à une dose de 3,8 kGy de rayonnement γ . La souche sauvage et les simples mutants $\Delta pprA$ ou $\Delta recN$ ont été suivis dans les mêmes conditions. Les bactéries non irradiées ont également été observées (**Figure 6 A**). En absence d'irradiation, les cellules des 4 souches présentent toutes une morphologie normale comparable à celle de la souche sauvage, les cellules sont associées en diplo- et tétracoques et le nucléoïde occupe un espace bien défini dans la cellule (**Figure 6 A**). Comme nous l'avons montré précédemment (Devigne *et al.*, 2013), après exposition à une dose de 3,8 kGy de rayonnement γ et 7h d'incubation post-irradiation, les cellules sauvages ont la même morphologie que les cellules non-irradiées alors que les cellules $\Delta pprA$ présentent de graves défauts de division cellulaire et de ségrégation des chromosomes (**Figure 6 B**). De façon étonnante, les bactéries $\Delta recN$, bien qu'ayant une survie de 100% à une dose de 3,8 kGy, ne présentent pas, 7h après irradiation, une morphologie similaire à celle de la souche sauvage. En effet, les cellules sont plus grosses et rondes et on peut noter un retard dans la formation des septums et la division cellulaire (**Figure 6 B**). Des anomalies de répartition de l'ADN entre cellules filles sont également observées dans une partie de la population, mais ces défauts ne sont pas comparables à ceux rencontrés chez un mutant $\Delta pprA$. Le phénotype du double mutant $\Delta pprA \Delta recN$ est identique à celui du simple mutant $\Delta recN$, avec, 7h après irradiation, des cellules plus volumineuses et plus rondes que les cellules sauvages ; on observe également dans ces conditions les mêmes retards dans la formation des septums que ceux observés dans les bactéries $\Delta recN$ (**Figure 6 B**).

Il reste à comprendre pourquoi les cellules dépourvues de RecN présentent une survie équivalente à celle d'une souche sauvage lorsqu'elles sont irradiées à une dose de 3,8 kGy alors que la morphologie des cellules laisse supposer des défauts qui pourraient compromettre la survie des cellules après irradiation. Cela suppose que les défauts observés 7 heures après irradiation chez le mutant $\Delta recN$ soient transitoires.



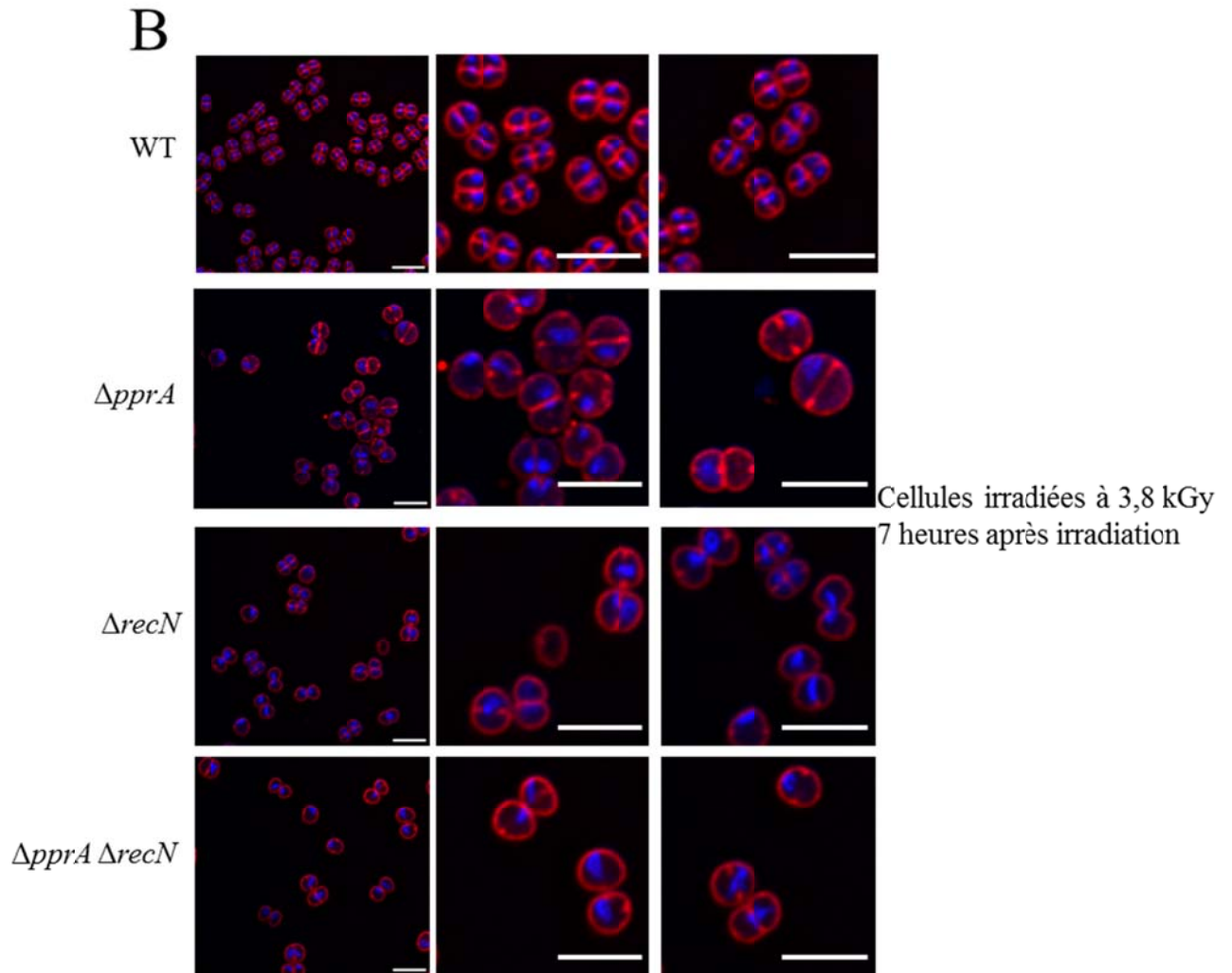


Figure 6 : Observation en microscopie à épifluorescence des bactéries sauvages, $\Delta pprA$, $\Delta recN$ et $\Delta pprA \Delta recN$ (A) avant irradiation et (B) après exposition à 3,8 kGy. Les membranes sont marquées au FM4-64 et apparaissent rouges ; les nucléoïdes sont marqués au DAPI et apparaissent bleus. Barre = 5 μ m.

(5) Les protéines PprA et RecN sont induites après irradiation

Pour visualiser les protéines PprA et RecN par Western blot ou dans des expériences de co-immuno-localisation, ces protéines ont été fusionnées respectivement à une étiquette HA ou FLAG. Nous avons déjà montré précédemment (Devigne *et al.*, 2013) que la protéine PprA fusionnée à une étiquette HA en position C-terminale était fonctionnelle. Ici nous avons remplacé dans la même souche le gène *pprA* au locus par un gène exprimant la protéine de fusion PprA::HA et le gène *recN* au locus par un gène exprimant une protéine de fusion RecN::FLAG. Les protéines PprA::HA et RecN::FLAG sont donc exprimées respectivement sous le contrôle des promoteurs naturels de *pprA* et *recN*. Le remplacement allélique sur

toutes les copies du génome du gène *recN* et du gène *pprA* par le gène étiqueté a été vérifié par PCR en utilisant l'ADN de la souche sauvage comme contrôle (résultats non montrés). Afin de vérifier la fonctionnalité de la protéine étiquetée RecN::FLAG, cette protéine de fusion a été introduite dans une souche étant dépourvue du gène *pprA*. La souche $\Delta pprA$ *recN*::FLAG (GY 14669) est alors obtenue. Le double mutant $\Delta pprA\Delta recN$ étant aussi radio-résistant que la souche $\Delta recN$, si la protéine de fusion n'est pas fonctionnelle, la souche $\Delta pprA$ *recN*::FLAG devrait présenter la même radio-résistance que le double mutant. Si la protéine de fusion est fonctionnelle, la souche devrait présenter la même radiosensibilité que la souche $\Delta pprA$. La courbe de survie aux rayonnements γ a donc été réalisée pour cette souche (**Figure 7**). La souche $\Delta pprA$ *recN*::FLAG présente une radiosensibilité similaire à celle de la souche $\Delta pprA$, la protéine de fusion RecN::FLAG est donc fonctionnelle. Une autre possibilité de vérification de la fonctionnalité de la construction RecN::FLAG serait de tester la survie de la souche exprimant cette protéine de fusion à la mitomycine, le mutant $\Delta recN$ y étant très sensible.

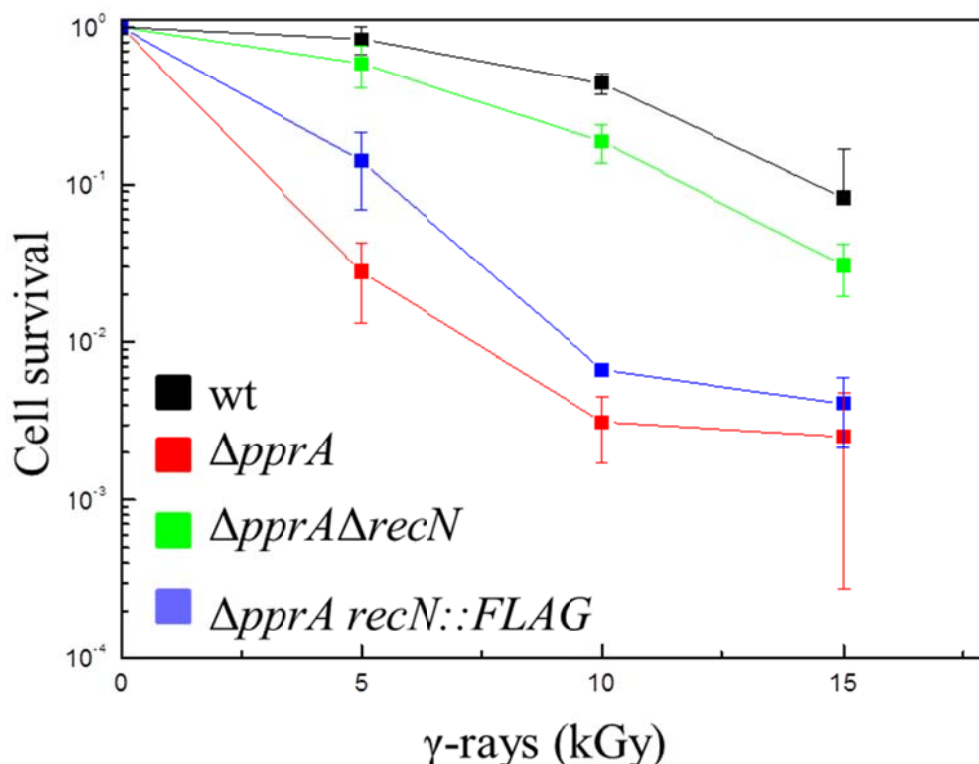


Figure 7 : Courbe de survie des souches de *D. radiodurans* sauvage (WT), $\Delta pprA$, $\Delta pprA\Delta recN$ et $\Delta pprA$ *recN*::FLAG aux rayonnements γ . Des dilutions adéquates des cultures non

irradiées ou exposées à différentes doses de rayonnements γ ont été étalées sur milieu gélosé sans antibiotique puis incubées à 30°C pendant 3 jours avant de compter les colonies.

Afin de suivre l'induction des 2 protéines après irradiation, des prélèvements avant et à différents temps d'incubation après irradiation des cellules exposées à 3,8 kGy de rayonnements γ ont été réalisés, les extraits protéiques ont été préparés, migrés sur gel et les protéines étiquetées ont été révélées par western blot (**Figure 8**). Sans irradiation, la protéine PprA::HA n'est pas détectée mais l'est rapidement après irradiation (piste 1 heure) et elle atteint son maximum d'induction 2 heures après irradiation, résultats conformes à ceux observés précédemment. La protéine RecN::FLAG est présente avant d'irradiation et sa concentration augmente aussi dès 1 heure après irradiation. Son maximum d'induction est atteint environ 3 heures après irradiation et sa concentration ne diminue pas avant 5 heures d'incubation après irradiation.

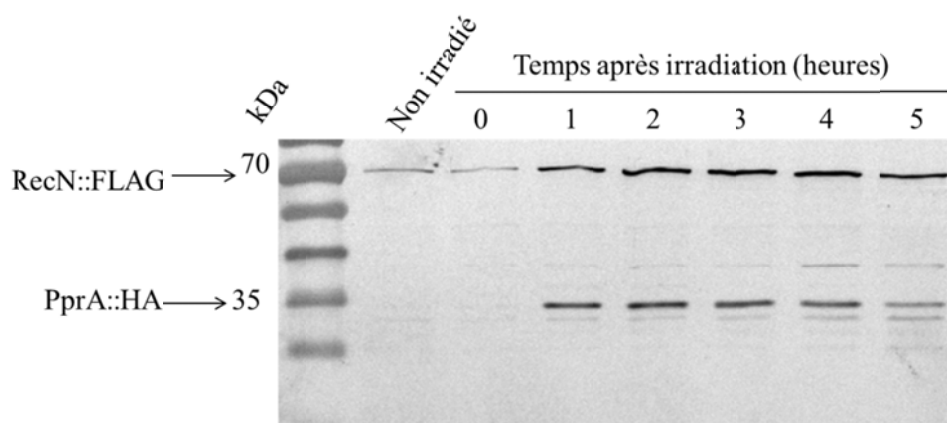


Figure 8 : Western Blot des protéines PprA::HA et RecN::FLAG étiquetées avant et à différents temps après irradiation à 3.8 kGy.

Afin de visualiser *in vivo* la localisation des protéines PprA et RecN, des immunomarquages sur la souche exprimant PprA::HA et RecN::FLAG ont été réalisés avant et après irradiation. Pour les cellules non irradiées la protéine PprA::HA n'est pas détectée et la protéine RecN::FLAG est présente dans le cytoplasme des cellules mais n'apparaît pas associée au nucléoïde (**Figure 8**). Trois heures après irradiation la protéine PprA::HA est localisée soit en association avec le nucléoïde soit sous forme de fin filament en travers du septum de division cellulaire reliant 2 cellules, résultats conformes à ce qui était observé précédemment (Devigne *et al.*, 2013). A ce même temps, RecN::FLAG forme des foci en périphérie du nucléoïde.

Cinq heures après irradiation, la protéine PprA::HA n'apparaît plus que sous forme de fins filaments localisés en travers du septum de division alors que la protéine RecN::FLAG est présente en moins grande quantité que 3 heures après irradiation, quelques foci sont encore visibles dans le cytoplasme des cellules (**Figure 9**).

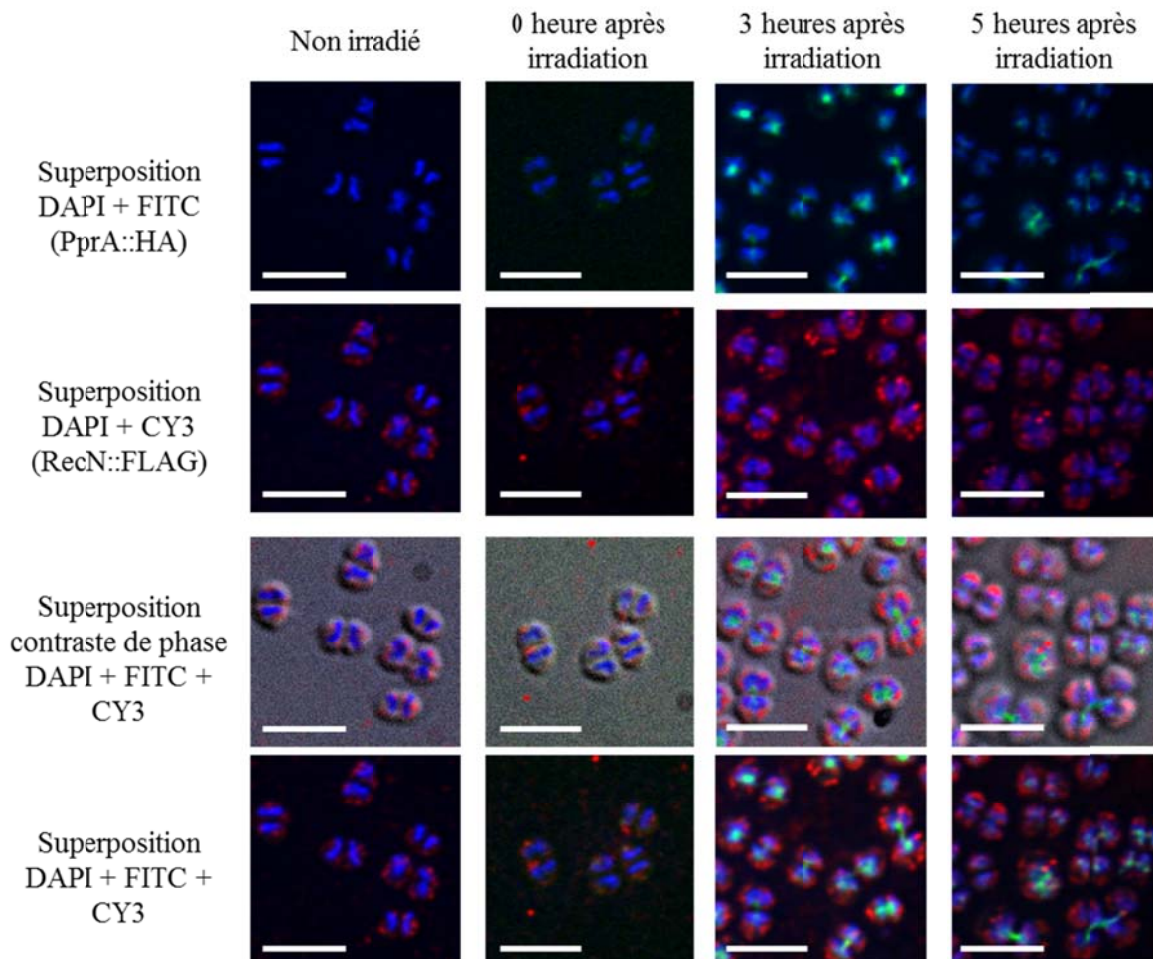


Figure 9 : Observation en microscopie à épifluorescence de la souche *pprA::HA recN::FLAG* (GY 14671) avant et après exposition à 3,8 kGy. Les nucléoïdes sont marqués au DAPI et apparaissent bleus, les protéines PprA::HA et RecN::FLAG sont marquées par les anticorps anti-HA et anti-FLAG et révélées après excitation de la fluorescéine (FITC) et CY3 donnant respectivement des colorations vertes et rouges.

Ces expériences préliminaires mettent en évidence un lien, entre la protéine spécifique des *Deinococcaceae* PprA et la protéine RecN appartenant à la famille des protéines SMC. La délétion du gène *recN* supprime le phénotype de sensibilité des mutants $\Delta pprA$ aux agents endommageant l'ADN testés. La nature précise du lien entre les deux protéines PprA et RecN reste à établir. Récemment un modèle a été proposé dans lequel RecN serait recruté très tôt au niveau des cassures double brin de l'ADN chez *D. radiodurans* permettant de maintenir les

extrémités proches l'une de l'autre (Pellegrino *et al.*, 2012b) dans un premier temps puis l'arrivée de la machinerie de réparation de l'ADN permettrait le décrochement de RecN. L'élimination des structures de l'ADN formées par RecN lors de ce recrutement pourraient avoir une importance dans la survie des cellules après réparation des cassures double brin de l'ADN. La résolution de ces structures pourrait être prise en charge de manière directe ou indirecte par la protéine PprA. Ainsi, dans un contexte $\Delta pprA$, les structures formées par RecN ne pouvant être résolues entraîneraient de graves problèmes au moment de la ségrégation des chromosomes. En se plaçant alors dans un contexte $\Delta pprA \Delta recN$, ces structures de l'ADN n'étant plus formés, les chromosomes des cellules pourraient alors se ségréger normalement.

Matériel & méthodes

(1) Souches bactériennes et conditions de culture

Toutes les souches de *D. radiodurans* utilisées sont des dérivées de la souche de référence ATCC 13939 (Tableau 1). Elles sont cultivées à 30°C dans le milieu TGY2x (1% tryptone, 0,2% dextrose, 0,6% extrait de levure) ou étalées sur milieu gélosé TGY-agar (TGY1x contenant 1,5% d'agar). Si nécessaire, de la kanamycine (6 µg/mL) ou du chloramphénicol (3,5 µg/mL) sont ajoutés au milieu de culture. Les plasmides utilisés pour l'amplification des cassettes de résistance aux antibiotiques sont décrits dans le tableau 1.

Tableau 1. Souches bactériennes et plasmides

souches	Génotype	Source ou référence
<i>D. radiodurans</i>		
R1	ATCC 13939	
GY 11983	$\Delta recN\Omega kan$	Collection du laboratoire
GY14665	$\Delta recN\Omega cat$	Ce travail
GY 12251	$\Delta pprA\Omega cat$	(Devigne <i>et al.</i> , 2013) (Bouthier de la Tour <i>et al.</i> , 2009)
GY 12428	$\Delta smc\Omega cat$	
GY 12909	$\Delta sbcC\Omega kan$	(Bentchikou <i>et al.</i> , 2007)
GY 14615	$pprA::HA-kan$	(Devigne <i>et al.</i> , 2013)
GY 14641	$\Delta pprA\Omega cat \Delta recN\Omega kan$	Ce travail
GY 14655	$pprA\Omega cat \Delta sbcC\Omega kan$	Ce travail
GY 14663	$\Delta pprA\Omega kan$	Ce travail
GY 14669	$\Delta pprA\Omega kan recN::FLAG-cat$	Ce travail
GY 14687	$\Delta pprA\Omega kan \Delta smc\Omega cat$	Ce travail
GY 14671	$pprA::HA-kan recN::FLAG-cat$	Ce travail
GY 15913	$recN::FLAG-cat$	Ce travail
GY 16111	$\Delta recN\Omega cat pprA::HA-kan$	Ce travail
Plasmides		
pGTC101	source de la cassette <i>cat</i> chez <i>D. radiodurans</i>	(Earl <i>et al.</i> , 2002b)
p11086	source de la cassette <i>kan</i> chez <i>D. radiodurans</i>	Collection du laboratoire
p12764	source de la cassette <i>HA-kan</i> chez <i>D. radiodurans</i>	Collection du laboratoire
p12723	source de la cassette <i>FLAG-cat</i> chez <i>D. radiodurans</i>	Collection du laboratoire

(2) Souches bactériennes et conditions de culture

D. radiodurans est naturellement compétente. Les cultures des cellules d'intérêt en phase exponentielle de croissance ($0.2 < A_{650} < 0.8$) sont centrifugées (10 min, 2 000 g, 4°C) puis reprises dans 1 mL de TGY 2X contenant 30mM de CaCl₂ et du glycérol à 20 %. Les cellules sont conservées à -80°C par aliquots de 100 µL. Au moment de la transformation, 10 ng d'ADN génomique ou 250 ng d'ADN contenu dans un mélange de ligation de fragments obtenus par PCR sont ajoutés à 100 µL de cellules décongelées. Les cellules sont laissées avec l'ADN 25 min dans la glace, puis 1 mL de TGY 2X est ajouté et le mélange est incubé pendant 4 à 6 heures à 30°C avec agitation (150 rpm). Des dilutions adéquates du mélange de transformation sont ensuite étalées sur milieu TGY-agar contenant de la kanamycine ou du chloramphénicol puis incubées 3 à 4 jours à 30°C avant de compter les colonies.

(3) Délétion de gènes et construction de souches exprimant des protéines étiquetées

Les allèles $\Delta pprA\Omega cat$, $\Delta recN\Omega kan$, $\Delta recN\Omega cat$ et $recN::FLAG$ ont été obtenus par la méthode de ligation tripartite (Menecier *et al.*, 2004). Pour cela la souche R1 a été transformée par des mélanges de ligation contenant 3 fragments amplifiés par PCR : une cassette de résistance à un antibiotique insérée entre des régions de 400 pb localisées en amont et aval du gène à déléter ou à fusionner, donnant naissance aux souches GY 14663 : $\Delta pprA\Omega kan$, GY 11983 : $\Delta recN\Omega kan$, GY 14665 : $\Delta recN\Omega cat$ et GY 15913 : $recN::FLAG$. L'amplification des fragments d'ADN par PCR a été réalisée en utilisant de l'ADN génomique ou plasmidique comme matrice, l'ADN polymérase Phusion (Thermo Scientific) (les séquences des oligonucléotides utilisés seront fournies à la demande).

L'allèle $recN::FLAG-cat$ a ensuite été introduit dans la souche GY14615 : $pprA::HA-kan$ par transformation par l'ADN génomique de la souche GY15913 donnant naissance à la souche GY14671 exprimant les protéines PprA et RecN étiquetées.

Pour toutes ces constructions, les colonies obtenues sont purifiées par plusieurs étapes de stries sur milieu sélectif pour permettre l'homogénéisation de l'information et le remplacement du gène sur toutes les copies du chromosome concerné. La structure génétique et la pureté des mutants construits sont vérifiées par PCR en utilisant l'ADN génomique des souches mutantes comme matrice, l'ADN polymérase Go Taq (Promega) (les séquences des oligonucléotides utilisés seront fournies à la demande).

(4) Extraction d'ADN génomique de *D. radiodurans*

2 mL de culture ($A_{650nm} > 3$) sont centrifugés, le culot cellulaire est repris dans 100 μ L de tampon de lyse (Tris HCl 0.01 M pH8, Triton 2X, SDS 1 %, NaCl 0.1 M, EDTA 0.001M); 100 μ L de phénol chloroforme (V/V) et 100 μ L de microbilles en verre (diamètre 0.5 mm) sont ajoutés. Les cellules sont cassées au Fastprep (4 cycles, force 4, 30 s). 100 μ L de SSC 1X sont ajoutés avant centrifugation (5 min, 11 000 g). Un traitement au phénol/chloroforme (V/V) est réalisé sur le surnageant. Après centrifugation (2 min, 11 000 g 4°C), la phase aqueuse (environ 180 μ L) est récupérée et mélangée à 400 μ L d'éthanol 100% froid. L'ADN précipité est récupéré par centrifugation (10 min, 11 000 g, 4°C). Un mL d'éthanol 70 % froid est ajouté au culot qui est ensuite centrifugé (5 min, 11 000 g, +4°C). Le culot est séché et repris dans 40 μ L de tampon TE (Tris HCl 10mM pH 7.5, EDTA 1mM) + RNase A (0,5mg/mL).

(5) Irradiation et courbes 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 exposées à différentes doses d'irradiation γ délivrées par l'irradiateur Poséidon du Laboratoire des Rayonnements Appliqués (LABRA) au CEA de Saclay (^{60}Co , débit de dose : 6 KGy/h). Après irradiation, 100 μ L de dilutions adéquates sont étalés sur milieu TGY-Agar. Les colonies sont comptées après incubation à 30°C pendant 3 à 4 jours.

Pour les expériences de microscopie, de cinétique de réparation de l'ADN et les immuno-détections, les échantillons sont soumis à une irradiation en utilisant l'irradiateur au ^{137}Cs générant des rayonnements à un débit de dose de 31 Gy/min (Institut Curie, Paris).

(6) Mesure de la sensibilité aux inhibiteurs de gyrase

Les souches sont cultivées en TGY2X jusqu'à une DO_{650} de 1. Des dilutions sérielles sont réalisées et des gouttes de 3 μ L sont déposées sur milieu gélosé TGY-agar contenant ou non de l'acide nalidixique à une concentration de 20 $\mu\text{g/mL}$ ou de la novobiocine à une concentration de 5 ng/mL .

(7) Cinétique de réparation des cassures double brin de l'ADN

500 μ L de cellules concentrées dans les conditions décrites ci-dessus sont irradiées à une dose de 5 kGy, un témoin non irradié est gardé dans la glace pendant la période d'irradiation et remis en culture comme les cellules irradiées. L'échantillon irradié est dilué 100 fois dans un milieu TGY2X ($A_{650nm} = 0.2$), les cellules sont ensuite incubées à 30°C avec agitation (150 rpm). A différents temps, 5 ml de culture sont prélevés, centrifugés (10 min, 2000 g, 4°C), lavés dans 1 mL de NaCl 0,9 % puis remis en suspension dans 150 μ L d'EDTA, 0.125M, pH8. Un volume de 150 μ L d'agarose à 1,6 % (Eurogentec), à l'état liquide, est ajouté. Le mélange est immédiatement coulé dans un moule rectangulaire. Les cellules incluses dans le cube d'agarose sont lysées en présence d'EDTA, 0,05M, pH8 contenant 2 mg/mL final de lysozyme pendant la nuit à 37°C. Une digestion à la protéinase K (1 mg/mL) est réalisée dans le tampon ESP (EDTA 0.5 M pH 9.5, lauroyl sarcosyl 10 %) à 50°C pendant la nuit. Les cubes d'agarose sont lavés 5 fois une heure avec 1 mL de tampon TE (Tris HCl pH7.5, EDTA 1mM). 1/5^{ème} des cubes d'agarose contenant l'ADN est digéré par 10 unités d'enzyme *NotI* (Fermentas). Ces cubes ainsi que les marqueurs de tailles (λ ladder PFG Markers, Biolabs) sont déposés sur un gel d'agarose [TBE 0.5 X, 1 % d'agarose (Agarose Electrophoresis Grade, Invitrogen)]. La migration est effectuée dans un appareil à électrophorèse en champ pulsé (Biorad, CHEF MAPPER) (angle de rotation 120° avec pulse linéaire de 10 s à 60 s à raison de 6V/cm), dans un tampon TBE 0.5 X pendant 22 heures à 12°C. Après coloration de l'ADN par du BET (1 μ g/mL) pendant 15 min, les différents profils de migration sont observés sous UV.

(8) Western blot

Les cellules irradiées à 3.8 kGy et non irradiées sont diluées en TGY 2x à une $A_{650nm}=0.2$ (t=0). A différents temps, 10 mL de culture sont centrifugés (10 min, 11000 g, 4°C). Le culot cellulaire est repris dans 150 μ L de tampon SSC 1X, 100 μ L de microbilles sont ajoutés ainsi que 0.6 μ L de Pefabloc à 100 mM. Les cellules sont lysées au Fast prep (4 cycles, force 4, 30 s) puis centrifugées (10 min, 11000 g, 4°C). Les protéines du surnageant sont dosées par la méthode de Bradford selon les recommandations du fournisseur (BIORAD). 5 μ g de protéines extraites sont dénaturées et séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12% en conditions dénaturantes 1.5 h à 80 V. Les protéines sont transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF). La membrane est

incubée 1 heure dans le tampon de blocage (tampon d'hybridation + 5 % de lait). Elle est rincée 5 min dans le tampon d'hybridation puis incubée une nuit à 4°C sous agitation douce avec les anticorps primaires anti-HA produits dans la souris (Eurogentec) dilués au 1/5000^{ème} dans le tampon d'hybridation contenant 3 % de lait. La membrane est rincée avec du tampon d'hybridation 4 à 5 fois. Elle est incubée 1 h avec la solution d'anticorps secondaires anti-anticorps de souris couplé à la phosphatase alcaline (Sigma) dilués au 1/10000 dans le tampon d'hybridation contenant 3% de lait. La membrane est rincée 4 à 5 fois avec du tampon d'hybridation. La membrane est incubée 10 min dans 10 mL de tampon postPA (Tris pH 9.5 100 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM). Les réactifs révélant la phosphatase alcaline sont ajoutés au tampon postPA (66 µL de nitro-blue tetrazolium et 33 µl de 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate) jusqu'à coloration des bandes. La quantification des bandes est faite avec le logiciel Image Lab (BIORAD).

(9) Microscopie à fluorescence

i. Marquage des cellules au FM4-64 et au DAPI :

Les cellules irradiées à 3.8 kGy et non irradiées sont diluées en TGY 2X à une $A_{650nm} = 0,2$ (t0). A différents temps, les cellules sont fixées au toluène (3 % final) et conservées à 4°C pour le marquage. Deux cents cinquante µL de cellules fixées sont centrifugés (10 min, 11 000 g, 4°C), le culot cellulaire est repris dans 250 µL de milieu TGY 2X. La membrane des cellules est colorée en rouge en ajoutant du FM4-64 à une concentration finale de 10 µg/mL pendant 4 min à température ambiante à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite centrifugées (10 min, 11 000 g, 4°C) le culot est repris dans 250 µL de DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) à 2 µg/mL pendant 4 min à l'abri de la lumière. Les échantillons sont centrifugés (10 min, 11 000 g, 4°C) l'excédent de DAPI est éliminé et le culot cellulaire est repris dans 20 µL de MgSO₄ à 10 mM. 1,5 µL de suspension cellulaire marquée est déposé sur une lame en verre ensuite recouverte d'une lamelle en verre. Les cellules sont observées au microscope Leica DM RXA, les images sont capturées par une caméra CDD 5 MHz Micromax 1300Y (Ropter Instruments). Le marquage membranaire par le FM4-64 est visualisé par excitation à 515 nm et émission à 640 nm ; le DAPI qui marque les acides nucléiques est excité à 350 nm et émet à 470 nm. Les membranes sont colorées en rouge et l'ADN en bleu. Enfin, la reconstitution des images finales est obtenue par déconvolution des Z-séries avec le logiciel Metamorph (Universal Imaging).

ii. Marquage immunofluorescent:

Les cellules irradiées à 3.8 KGy ou non irradiées sont diluées en TGY 2X à une $A_{650nm} = 0,2$ et incubées à 30°C. Des aliquotes (0.5 mL) sont prélevés à différents temps, et les cellules sont fixées au formaldéhyde (3,7 %) pendant 16 h à 4°C. Après centrifugation (5 min, 5 000 g, 4°C), les cellules sont reprises dans 500 µL de PBS 1X. Après centrifugation (5 min, 5 000 g, 4°C) les culots cellulaires sont repris dans 100µL de lysozyme à 4 mg/mL pendant 30 min à 37°C. Les cellules sont ensuite centrifugées (5 min, 5000 g, 4°C) reprises dans 250 µL de PBS 1X, centrifugées puis remises en suspension dans 200 µL d'une solution de PBS contenant 0.1% de Triton pendant 5 min à température ambiante. Huit cents µL de PBS sont ajoutés puis les cellules sont rapidement centrifugées. Les cellules sont ensuite reprises dans 500 µL de PBS 1X. Après centrifugation les culots cellulaires sont remis en suspension dans 40 µL de PBS 1X. Trois µL de suspension cellulaire sont déposés sur une lame à spots prétraités pendant 5 min par de la poly-L-lysine 0.1 %. Toutes les incubations suivantes se font en boîte humidifiée et à température ambiante. Chaque spot est recouvert de formaldéhyde 3.7 %. Les lames sont laissées 20 min à 37°C. Le formaldéhyde est éliminé, les spots sont lavés avec du PBS 1X, puis sont recouverts d'une goutte de solution de blocage (Sérum Albumine Bovine 2 % final, Tween 20 0.05 % finale en PBS 1X) pendant 45 min. La solution de blocage est éliminée puis chaque spot est recouvert d'une goutte de solution d'anticorps primaires anti-HA produits dans la souris et d'anticorps primaires anti-FLAG produits dans le lapin (Eurogentec et Sigma) dilués au 1/700^{ème} dans la solution de blocage. Les lames sont incubées 2 h à 37°C. La solution d'anticorps est éliminée puis les lames sont lavées 20 min dans une solution de lavage (Tween 20 0.05 % final en PBX 1X). Les lames sont séchées puis les spots sont recouverts de solution d'anticorps secondaires anti anticorps de souris couplés à la fluorescéine isothiocyanate (FITC, Jackson Immunoresearch Laboratory) et d'anticorps secondaires anti anticorps de lapin couplés au CY3 dilués au 1/250^{ème} dans la solution de blocage. Les lames sont incubées 1 h à 37°C. La solution d'anticorps est éliminée puis les lames sont lavées 20 min dans un bain neuf de solution de lavage puis séchées. Les spots sont recouverts d'une goutte de DAPI à 5 µg/mL pendant 10 min. La solution de DAPI est éliminée puis les lames sont lavées 10 min dans un bain neuf de solution de lavage. Les lames sont séchées, une goutte de Fluoromount G (Fluoprobes) est déposée sur chaque spot et une lamelle de verre est montée sur chaque lame. Les lames sont observées au microscope Leica décrit ci-dessus. La fluorescéine est excitée à 490 nm et émet à 520 nm le CY3 est excité à 550 nm et émet à 570 nm.

CONCLUSION - PERSPECTIVES

Deinococcus radiodurans est une bactérie qui a une exceptionnelle capacité à surmonter les effets délétères des agents qui endommagent l'ADN. Elle est un des organismes les plus radiorésistants connus à ce jour. En effet, alors que la plupart des bactéries ne peuvent supporter des doses d'irradiation de rayonnements γ de quelques centaines de Gray, *D. radiodurans* peut supporter des doses d'irradiation de 5000 Grays sans que sa survie en soit affectée. La clé de sa radiorésistance n'est pas liée à des mécanismes de protection qui limiteraient le nombre de cassures provoquées par les radiations, ce nombre de cassure étant identique à celui mesuré chez des bactéries radiosensibles. Cette extrême radiorésistance résulte de la conjonction de plusieurs facteurs et mécanismes qui agissent de concert lorsque des lésions sont provoquées sur l'ADN par les irradiations. Parmi ces mécanismes, on peut citer une réparation des cassures de l'ADN particulièrement efficace, une protection des protéines contre l'oxydation, une structure compacte du nucléoïde et la présence de protéines spécifiques des *Deinococcaceae* induites après irradiation.

La protéine PprA, qui a fait l'objet de mes travaux de thèse, fait partie de ces protéines spécifiques aux *Deinococcaceae*. Son expression est induite après irradiation et le mutant de délétion $\Delta pprA$ est très sensible aux rayonnements γ en comparaison d'une souche sauvage (Tanaka *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent une implication de PprA dans la radiorésistance chez *D. radiodurans*. Les expériences de caractérisation des activités de PprA menées *in vitro* suggèrent que cette protéine pourrait jouer un rôle important dans un mécanisme de réparation des cassures de l'ADN de type NHEJ, bien qu'un tel mécanisme n'ait jamais été démontré chez *D. radiodurans* (Narumi *et al.*, 2004, Kota & Misra, 2008, Kota *et al.*, 2010). Nous avons montré que le double mutant $\Delta pprA \Delta recA$ n'était pas plus radiosensible que le simple mutant $\Delta recA$. De plus, la reconstitution partielle du génome observée dans un mutant dépourvu de la protéine RecA est maintenue chez le double mutant $\Delta pprA \Delta recA$. Ces résultats suggèrent que si PprA intervient dans un mécanisme de réparation de l'ADN, elle a d'une part un rôle mineur (car les cellules dépourvues de PprA réparent leur ADN avec un retard de 30 minutes à 1 heure seulement), et d'autre part, PprA n'intervient pas dans un mécanisme indépendant de RecA des cassures double brin de l'ADN. Il a par ailleurs été montré qu'un mutant $\Delta ddrB \Delta recA$ est plus sensible aux rayonnements γ qu'un simple mutant $\Delta recA$ et la reconstitution partielle du génome observée dans un mutant $\Delta recA$ est complètement abolie dans le double mutant $\Delta ddrB \Delta recA$ (Xu *et al.*, 2010). Nos résultats ne sont donc pas en faveur d'une implication de PprA dans la réparation des cassures de l'ADN

dans un mécanisme de type NHEJ ou indépendant de RecA. Par contre nous avons montré que la protéine PprA est nécessaire à la ségrégation efficace des chromosomes après irradiation chez la bactérie *D. radiodurans*. En effet, après irradiation, les cellules dépourvues de la protéine PprA présentent de graves défauts de ségrégation des chromosomes et de division cellulaire. L'ADN est coincé au niveau du septum de division cellulaire et ne parvient pas à se répartir correctement entre deux cellules filles.

La ségrégation des chromosomes est un processus progressif : les régions origine nouvellement synthétisées ségrégent rapidement après leur réplication, le « corps » du chromosome est ensuite ségrégé progressivement et enfin, les régions terminus sont ségrégées après une période de cohésion plus longue [voir pour revue (Possoz *et al.*, 2012, Toro & Shapiro, 2010)]. Les résultats que nous avons obtenus en caractérisant le mutant $\Delta pprA$, suggèrent que la protéine PprA pourrait être impliquée probablement au cours de la ségrégation des régions terminus qui nécessite la décaténation des chromosomes et la résolution des dimères de chromosomes pour assurer la séparation complète des chromosomes nouvellement synthétisés.

Récemment au laboratoire, un système génétique a été mis au point pour localiser les régions chromosomiques (origine de réplication, la région Ter, locus localisé dans le bras gauche) du chromosome 1 (Passot *et al.*, 2015). Effectuer une localisation de ces loci dans un mutant $\Delta pprA$ permettrait une analyse de leur ségrégation après irradiation lors de la reprise de la division cellulaire.

L'identification des partenaires de PprA a pu être réalisée par co-immunoprécipitation des protéines avec la protéine PprA étiquetée, suivie d'une analyse par spectrométrie de masse. Parmi les protéines identifiées, nous avons pu montrer que PprA interagit *in vivo* avec les sous unités GyrA et GyrB de l'ADN gyrase. Chez *D. radiodurans*, l'ADN gyrase est la seule topoisomérase de type II, son génome ne contient pas les gènes codant l'ADN topoisomérase IV. Chez *E. coli*, l'ADN topoisomérase IV est l'ADN topoisomérase de type II responsable de la décaténation des chromosomes au cours de leur ségrégation. *In vitro*, nous avons montré que PprA stimule l'activité de décaténation de l'ADN gyrase, mais n'a pas d'influence sur son activité de surenroulement négatif de l'ADN. Après irradiation, l'ADN est morcelé en centaines de fragments. Lorsque l'ADN est réparé et que les chromosomes circulaires ont été

reformés, l'ADN est globalement sous une forme relâchée et l'ADN gyrase est probablement sollicitée. La protéine PprA en interagissant avec l'ADN gyrase après irradiation pourrait faciliter la re-localisation de cette dernière au niveau du septum de division cellulaire. Récemment il a été montré que PprA a la capacité de polymériser sur de l'ADN double brin (Adachi *et al.*, 2014). Un modèle pourrait être imaginé, dans lequel PprA agirait de la même manière que la condensine MukB d'*E. coli* et remodelerait l'ADN générant ainsi un substrat préférentiel pour l'ADN gyrase et stimulant l'activité de décaténation de cette dernière.

Les expériences d'immunoprécipitation qui ont permis d'identifier l'ADN gyrase comme interagissant physique de PprA ont été réalisées 1h50 après irradiation, temps qui correspond approximativement au maximum d'induction de la protéine. Il serait intéressant de reproduire ces expériences d'immunoprécipitation à différents temps après irradiation, notamment dans les temps tardifs après irradiation, lorsque que PprA est localisée au niveau du septum de division cellulaire. Ces expériences pourraient permettre d'identifier d'autres protéines impliquées dans la ségrégation des chromosomes en fin de réplication.

La possible implication de PprA dans un mécanisme de ségrégation des chromosomes nous a conduits à explorer sa potentielle interaction avec les protéines de la famille SMC. Chez *D. radiodurans*, 3 protéines appartiennent à la famille SMC, la protéine SMC, la protéine SbcC et la protéine RecN. Le mutant de délétion $\Delta recN$ présente la même radiorésistance qu'une souche sauvage. De manière surprenante, lorsque la délétion $\Delta recN$ est introduite dans un mutant $\Delta pprA$, la souche ne présente plus les sensibilités aux agents endommageant l'ADN comme les rayonnements γ , l'acide nalidixique et la novobiocine qui sont observées dans un simple mutant $\Delta pprA$. Ces expériences montrent une interaction génétique entre *pprA* et *recN*.

Un récent modèle propose que RecN agissent comme une cohésine et permettrait, lorsque des cassures double brin sont provoquée sur l'ADN, de maintenir proche les extrémités générées (Pellegrino *et al.*, 2012b). Compte tenu de nos résultats concernant le double mutant $\Delta pprA \Delta recN$, nous pourrions imaginer que la protéine PprA soit nécessaire à la résolution des structures de l'ADN intermédiaires formées par RecN lors du maintien de ces extrémités d'ADN. Dans un tel système, l'absence de PprA ne permettrait pas la résolution de ces structures d'ADN, elles persisteraient alors et seraient délétères pour la survie des cellules.

Ces travaux montrent clairement que la protéine PprA joue un rôle important dans la radiorésistance de la bactérie *D. radiodurans* en intervenant dans la ségrégation des chromosomes après irradiation et en interagissant avec l'ADN gyrase. Par contre, la ségrégation des chromosomes et la division cellulaire se déroulent normalement en absence de PprA si les cellules ne sont pas irradiées ou exposées à des inhibiteurs d'ADN gyrase. De plus le mutant de *D. radiodurans* dépourvu de la protéine SMC a une croissance tout à fait normale sans problème de ségrégation des chromosomes (Bouthier de la Tour *et al.*, 2009). Ces différents résultats posent la question des mécanismes impliqués dans la division cellulaire chez ce micro-organisme. Les différents acteurs de la ségrégation des chromosomes chez *D. radiodurans* sont pas du tout établis, la majeure partie des études sur la ségrégation des chromosomes étant menées sur des bactéries en forme de bâtonnets comme *E. coli* et *B. subtilis*. La question du déroulement de ces mécanismes chez des bactéries en forme de coque reste encore entièrement ouverte. La détermination des réseaux d'interactants protéiques et génétiques de l'ADN gyrase et de PprA pourra apporter des pistes sur la mise en place de ces mécanismes.

REFERENCES

Références Bibliographiques

- Adachi, M., H. Hirayama, R. Shimizu, K. Satoh, I. Narumi & R. Kuroki, (2014) Interaction of double-stranded DNA with polymerized PprA protein from *Deinococcus radiodurans*. *Protein Sci* **23**: 1349-1358.
- Adachi, S. & S. Hiraga, (2003) Mutants suppressing novobiocin hypersensitivity of a *mukB* null mutation. *Journal of bacteriology* **185**: 3690-3695.
- Adams, D.W. & J. Errington, (2009) Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nature reviews. Microbiology* **7**: 642-653.
- Ali Azam, T., A. Iwata, A. Nishimura, S. Ueda & A. Ishihama, (1999) Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *Journal of bacteriology* **181**: 6361-6370.
- Allardet-Servent, A., S. Michaux-Charachon, E. Jumas-Bilak, L. Karayan & M. Ramuz, (1993) Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. *Journal of bacteriology* **175**: 7869-7874.
- Almiron, M., A.J. Link, D. Furlong & R. Kolter, (1992) A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes & development* **6**: 2646-2654.
- 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.
- Anderson, D.G. & S.C. Kowalczykowski, (1997) The translocating RecBCD enzyme stimulates recombination by directing RecA protein onto ssDNA in a chi-regulated manner. *Cell* **90**: 77-86.
- Azam, T.A. & A. Ishihama, (1999) Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *The Journal of biological chemistry* **274**: 33105-33113.
- Bartosik, A.A., K. Lasocki, J. Mierzejewska, C.M. Thomas & G. Jagura-Burdzy, (2004) ParB of *Pseudomonas aeruginosa*: interactions with its partner ParA and its target parS and specific effects on bacterial growth. *Journal of bacteriology* **186**: 6983-6998.
- Bentchikou, E., P. Servant, G. Coste & S. Sommer, (2007) Additive effects of SbcCD and PolX deficiencies in the in vivo repair of DNA double strand breaks in *Deinococcus radiodurans*. *Journal of bacteriology*.
- 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.
- Bernhardt, T.G. & P.A. de Boer, (2005) SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. *Molecular cell* **18**: 555-564.
- Bessman, M.J., D.N. Frick & S.F. O'Handley, (1996) The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes. *The Journal of biological chemistry* **271**: 25059-25062.
- Bhattacharyya, G. & A. Grove, (2007) The N-terminal extensions of *Deinococcus radiodurans* Dps-1 mediate DNA major groove interactions as well as assembly of the dodecamer. *The Journal of biological chemistry* **282**: 11921-11930.
- Bi, H. & C. Zhang, (2014) Integration host factor is required for the induction of acid resistance in *Escherichia coli*. *Current microbiology* **69**: 218-224.

- Bigot, S., O.A. Saleh, C. Lesterlin, C. Pages, M. El Karoui, C. Dennis, M. Grigoriev, J.F. Allemand, F.X. Barre & F. Cornet, (2005) KOPS: DNA motifs that control *E. coli* chromosome segregation by orienting the FtsK translocase. *The EMBO journal* **24**: 3770-3780.
- Bigot, S., V. Sivanathan, C. Possoz, F.X. Barre & F. Cornet, (2007) FtsK, a literate chromosome segregation machine. *Molecular microbiology* **64**: 1434-1441.
- Blasius, M., U. Hubscher & S. Sommer, (2008) *Deinococcus radiodurans*: what belongs to the survival kit? *Crit Rev Biochem Mol Biol* **43**: 221-238.
- 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. *Molecular genetics and genomics : MGG* **268**: 28-41.
- Bosch, L., L. Nilsson, E. Vijgenboom & H. Verbeek, (1990) FIS-dependent trans-activation of tRNA and rRNA operons of *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta* **1050**: 293-301.
- Bouffartigues, E., M. Buckle, C. Badaut, A. Travers & S. Rimsky, (2007) H-NS cooperative binding to high-affinity sites in a regulatory element results in transcriptional silencing. *Nature structural & molecular biology* **14**: 441-448.
- 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* **10**: 1223-1231.
- Bouthier de la Tour, C., M. Toueille, E. Jolivet, H.H. Nguyen, P. Servant, F. Vannier & S. Sommer, (2009) The *Deinococcus radiodurans* SMC protein is dispensable for cell viability yet plays a role in DNA folding. *Extremophiles : life under extreme conditions* **13**: 827-837.
- Bremer, H. & P. Dennis, (1987) Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. F.N.a. others (ed). Washington DC: American Society for Microbiology, pp. 1527-1542.
- Britton, R.A., D.C. Lin & A.D. Grossman, (1998) Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning. *Genes & development* **12**: 1254-1259.
- Brooks, B. & R. 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* **31**: 353-360.
- Carballido-Lopez, R., A. Formstone, Y. Li, S.D. Ehrlich, P. Noirot & J. Errington, (2006) Actin homolog MreBH governs cell morphogenesis by localization of the cell wall hydrolase LytE. *Developmental cell* **11**: 399-409.
- Charaka, V.K. & H.S. Misra, (2012) Functional characterization of the role of the chromosome I partitioning system in genome segregation in *Deinococcus radiodurans*. *Journal of bacteriology* **194**: 5739-5748.
- Confalonieri, F. & S. Sommer, (2011) Bacterial and archaeal resistance to ionizing radiation. *J Phys* doi:10.1088/1742-6596/261/1/012005.
- Connelly, J.C., E.S. de Leau & D.R. Leach, (1999) DNA cleavage and degradation by the SbcCD protein complex from *Escherichia coli*. *Nucleic acids research* **27**: 1039-1046.
- Connelly, J.C., L.A. Kirkham & D.R. Leach, (1998) The SbcCD nuclease of *Escherichia coli* is a structural maintenance of chromosomes (SMC) family protein that cleaves hairpin DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 7969-7974.

- Connelly, J.C. & D.R. Leach, (2002) Tethering on the brink: the evolutionarily conserved Mre11-Rad50 complex. *Trends in biochemical sciences* **27**: 410-418.
- Crisona, N.J., T.R. Strick, D. Bensimon, V. Croquette & N.R. Cozzarelli, (2000) Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by *E. coli* topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements. *Genes & development* **14**: 2881-2892.
- Cromie, G.A. & D.R. Leach, (2001) Recombinational repair of chromosomal DNA double-strand breaks generated by a restriction endonuclease. *Molecular microbiology* **41**: 873-883.
- 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 biology* **5**: e92.
- 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.
- Dame, R.T., C. Wyman & N. Goosen, (2000) H-NS mediated compaction of DNA visualised by atomic force microscopy. *Nucleic acids research* **28**: 3504-3510.
- 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.
- Devigne, A., C. Bouthier de la Tour, P. Guérin, J. Lisboa, S. Quevillon-Cheruel, J. Armengaud, S. Sommer & P. Servant, (2015a) PprA protein is involved in chromosome segregation via its physical and functional interaction with DNA gyrase in irradiated *Deinococcus radiodurans* bacteria. *Nucleic Acid Research* **submitted**.
- Devigne, A., S. Ithurbide, C. Bouthier de la Tour, F. Passot, M. Mathieu, S. Sommer & P. Servant, (2015b) 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* **12**: 265-272.
- Di Ventura, B., B. Knecht, H. Andreas, W.J. Godinez, M. Fritsche, K. Rohr, W. Nickel, D.W. Heermann & V. Sourjik, (2013) Chromosome segregation by the *Escherichia coli* Min system. *Molecular systems biology* **9**: 686.
- DiGate, R.J. & K.J. Mariani, (1992) *Escherichia coli* topoisomerase III-catalyzed cleavage of RNA. *The Journal of biological chemistry* **267**: 20532-20535.
- Dillingham, M.S. & S.C. Kowalczykowski, (2008) RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **72**: 642-671, Table of Contents.
- Dillingham, M.S., M. Spies & S.C. Kowalczykowski, (2003) RecBCD enzyme is a bipolar DNA helicase. *Nature* **423**: 893-897.
- Drlica, K. & X. Zhao, (1997) DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **61**: 377-392.

- Dworkin, J. & R. Losick, (2002) Does RNA polymerase help drive chromosome segregation in bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 14089-14094.
- 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 *UvsE* gene product of *Deinococcus radiodurans* R1 is a UV damage endonuclease. *Journal of bacteriology* **184**: 1003-1009.
- Espeli, O., R. Borne, P. Dupaigne, A. Thiel, E. Gigant, R. Mercier & F. Boccard, (2012) A MatP-divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in *E. coli*. *The EMBO journal* **31**: 3198-3211.
- Espeli, O., C. Lee & K.J. Marians, (2003a) A physical and functional interaction between *Escherichia coli* FtsK and topoisomerase IV. *The Journal of biological chemistry* **278**: 44639-44644.
- Espeli, O., C. Levine, H. Hassing & K.J. Marians, (2003b) Temporal regulation of topoisomerase IV activity in *E. coli*. *Molecular cell* **11**: 189-201.
- Espeli, O., R. Mercier & F. Boccard, (2008) DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the *E. coli* chromosome. *Molecular microbiology* **68**: 1418-1427.
- Fekete, R.A. & D.K. Chattoraj, (2005) A cis-acting sequence involved in chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **55**: 175-183.
- 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. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 939-947.
- Figge, R.M., J. Easter & J.W. Gober, (2003) Productive interaction between the chromosome partitioning proteins, ParA and ParB, is required for the progression of the cell cycle in *Caulobacter crescentus*. *Molecular microbiology* **47**: 1225-1237.
- Frenkiel-Krispin, D., S. Levin-Zaidman, E. Shimoni, S.G. Wolf, E.J. Wachtel, T. Arad, S.E. Finkel, R. Kolter & A. Minsky, (2001) Regulated phase transitions of bacterial chromatin: a non-enzymatic pathway for generic DNA protection. *The EMBO journal* **20**: 1184-1191.
- 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*. *Mutation research* **435**: 151-161.
- Gellert, M., M.H. O'Dea, T. Itoh & J. Tomizawa, (1976) Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**: 4474-4478.
- 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*. *Molecular genetics and genomics* : **MGG** **266**: 72-78.
- Gerber, E., R. Bernard, S. Castang, N. Chabot, F. Coze, A. Dreux-Zigha, E. Hauser, P. Hivin, P. Joseph, C. Lazarelli, G. Letellier, J. Olive & J.P. Leonetti, (2015) *Deinococcus* as new chassis for industrial biotechnology: biology, physiology and tools. *Journal of applied microbiology* **119**: 1-10.
- Gigant, E., (2012) La cohésion des chromatides sœurs chez *Escherichia coli*. In.: Paris-Sud, pp.
- Godfrin-Estevenson, A.M., F. Pasta & D. Lane, (2002) The *parAB* gene products of *Pseudomonas putida* exhibit partition activity in both *P. putida* and *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **43**: 39-49.

- Gong, C., P. Bongiorno, A. Martins, N.C. Stephanou, H. Zhu, S. Shuman & M.S. Glickman, (2005) Mechanism of nonhomologous end-joining in mycobacteria: a low-fidelity repair system driven by Ku, ligase D and ligase C. *Nature structural & molecular biology* **12**: 304-312.
- Gottesman, S., (2003) Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annual review of cell and developmental biology* **19**: 565-587.
- Graumann, P.L. & T. Knust, (2009) Dynamics of the bacterial SMC complex and SMC-like proteins involved in DNA repair. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* **17**: 265-275.
- Graumann, P.L., R. Losick & A.V. Strunnikov, (1998) Subcellular localization of *Bacillus subtilis* SMC, a protein involved in chromosome condensation and segregation. *Journal of bacteriology* **180**: 5749-5755.
- 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.
- Gruber, S. & J. Errington, (2009) Recruitment of condensin to replication origin regions by ParB/SpoOJ promotes chromosome segregation in *B. subtilis*. *Cell* **137**: 685-696.
- Haikarainen, T. & A.C. Papageorgiou, (2010) Dps-like proteins: structural and functional insights into a versatile protein family. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **67**: 341-351.
- 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 biology* **2**: e304.
- Harsojo, S. Kitayama & A. Matsuyama, (1981) Genome multiplicity and radiation resistance in *Micrococcus radiodurans*. *Journal of biochemistry* **90**: 877-880.
- Hayama, R. & K.J. Mariani, (2010) Physical and functional interaction between the condensin MukB and the decatenase topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 18826-18831.
- Heidelberg, J.F., J.A. Eisen, W.C. Nelson, R.A. Clayton, M.L. Gwinn, R.J. Dodson, D.H. Haft, E.K. Hickey, J.D. Peterson, L. Umayam, S.R. Gill, K.E. Nelson, T.D. Read, H. Tettelin, D. Richardson, M.D. Ermolaeva, J. Vamathevan, S. Bass, H. Qin, I. Dragoi, P. Sellers, L. McDonald, T. Utterback, R.D. Fleishmann, W.C. Nierman, O. White, S.L. Salzberg, H.O. Smith, R.R. Colwell, J.J. Mekalanos, J.C. Venter & C.M. Fraser, (2000) DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**: 477-483.
- Hengge, R. & B. Bukau, (2003) Proteolysis in prokaryotes: protein quality control and regulatory principles. *Molecular microbiology* **49**: 1451-1462.
- Hiasa, H. & K.J. Mariani, (1996) Two distinct modes of strand unlinking during theta-type DNA replication. *The Journal of biological chemistry* **271**: 21529-21535.
- Hiraga, S., C. Ichinose, H. Niki & M. Yamazoe, (1998) Cell cycle-dependent duplication and bidirectional migration of SeqA-associated DNA-protein complexes in *E. coli*. *Molecular cell* **1**: 381-387.
- Hirano, M., D.E. Anderson, H.P. Erickson & T. Hirano, (2001) Bimodal activation of SMC ATPase by intra- and inter-molecular interactions. *The EMBO journal* **20**: 3238-3250.
- Hirano, M. & T. Hirano, (2002) Hinge-mediated dimerization of SMC protein is essential for its dynamic interaction with DNA. *The EMBO journal* **21**: 5733-5744.

- Hirano, T., (1999) SMC-mediated chromosome mechanics: a conserved scheme from bacteria to vertebrates? *Genes & development* **13**: 11-19.
- Hirano, T., (2002) The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes & development* **16**: 399-414.
- 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.
- Hojgaard, A., H. Szerlong, C. Tabor & P. Kuempel, (1999) Norfloxacin-induced DNA cleavage occurs at the dif resolvase locus in *Escherichia coli* and is the result of interaction with topoisomerase IV. *Molecular microbiology* **33**: 1027-1036.
- Hsieh, T.J., L. Farh, W.M. Huang & N.L. Chan, (2004) Structure of the topoisomerase IV C-terminal domain: a broken beta-propeller implies a role as geometry facilitator in catalysis. *The Journal of biological chemistry* **279**: 55587-55593.
- Hsieh, T.S. & J.C. Wang, (1975) Thermodynamic properties of superhelical DNAs. *Biochemistry* **14**: 527-535.
- 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.
- Ireton, K., N.W.t. Gunther & A.D. Grossman, (1994) *spo0J* is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **176**: 5320-5329.
- Jakimowicz, D., A. Brzostek, A. Rumijowska-Galewicz, P. Zydek, A. Dolzblasz, A. Smulczyk-Krawczynszyn, T. Zimniak, L. Wojtasz, A. Zawilak-Pawlik, A. Kois, J. Dziadek & J. Zakrzewska-Czerwinska, (2007) Characterization of the mycobacterial chromosome segregation protein ParB and identification of its target in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **153**: 4050-4060.
- Jensen, R.B. & L. Shapiro, (1999) The *Caulobacter crescentus smc* gene is required for cell cycle progression and chromosome segregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 10661-10666.
- Jensen, R.B. & L. Shapiro, (2003) Cell-cycle-regulated expression and subcellular localization of the *Caulobacter crescentus* SMC chromosome structural protein. *Journal of bacteriology* **185**: 3068-3075.
- Jessberger, R., (2002) The many functions of SMC proteins in chromosome dynamics. *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**: 767-778.
- 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.
- Jones, L.J., R. Carballido-Lopez & J. Errington, (2001) Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**: 913-922.
- Joshi, B., R. Schmid, K. Altendorf & S.K. Apte, (2004) Protein recycling is a major component of post-irradiation recovery in *Deinococcus radiodurans* strain R1. *Biochemical and biophysical research communications* **320**: 1112-1117.
- Kang, S., J.S. Han, J.H. Park, K. Skarstad & D.S. Hwang, (2003) SeqA protein stimulates the relaxing and decatenating activities of topoisomerase IV. *The Journal of biological chemistry* **278**: 48779-48785.
- 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.
- Kelly, A., M.D. Goldberg, R.K. Carroll, V. Danino, J.C. Hinton & C.J. Dorman, (2004) A global role for Fis in the transcriptional control of metabolism and type III secretion in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Microbiology* **150**: 2037-2053.
- 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. *The Journal of biological chemistry* **288**: 29229-29237.
- 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.
- Kota, S., V.K. Charaka & H.S. Misra, (2014a) PprA, a pleiotropic protein for radioresistance, works through DNA gyrase and shows cellular dynamics during postirradiation recovery in *Deinococcus radiodurans*. *J Genet* **93**: 349-354.
- Kota, S., V.K. Charaka, S. Ringgaard, M.K. Waldor & H.S. Misra, (2014b) PprA contributes to *Deinococcus radiodurans* resistance to nalidixic acid, genome maintenance after DNA damage and interacts with deinococcal topoisomerases. *PLoS one* **9**: e85288.
- Kota, S., V.A. Kamble, Y.S. Rajpurohit & H.S. Misra, (2010) ATP-type DNA ligase requires other proteins for its activity *in vitro* and its operon components for radiation resistance in *Deinococcus radiodurans* *in vivo*. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **88**: 783-790.
- Kota, S. & H.S. Misra, (2006) PprA: A protein implicated in radioresistance of *Deinococcus radiodurans* stimulates catalase activity in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology* **72**: 790-796.
- Kota, S. & H.S. Misra, (2008) Identification of a DNA processing complex from *Deinococcus radiodurans*. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **86**: 448-458.
- Kowalczykowski, S.C., (2000) Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends in biochemical sciences* **25**: 156-165.
- 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.
- Krogh, B.O. & S. Shuman, (2002) A poxvirus-like type IB topoisomerase family in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 1853-1858.
- Le, S., J.K. Moore, J.E. Haber & C.W. Greider, (1999) RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics* **152**: 143-152.
- Lecointe, F., G. Coste, S. Sommer & A. Bailone, (2004a) Vectors for regulated gene expression in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Gene* **336**: 25-35.
- Lecointe, F., I.V. Shevelev, A. Bailone, S. Sommer & U. Hubscher, (2004b) Involvement of an X family DNA polymerase in double-stranded break repair in the radioresistant organism *Deinococcus radiodurans*. *Molecular microbiology* **53**: 1721-1730.
- Lee, P.S. & A.D. Grossman, (2006) The chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB) contribute to accurate chromosome partitioning, separation of replicated sister origins, and regulation of replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* **60**: 853-869.
- Lemon, K.P. & A.D. Grossman, (2001) The extrusion-capture model for chromosome partitioning in bacteria. *Genes & development* **15**: 2031-2041.

- Lesterlin, C., F.X. Barre & F. Cornet, (2004) Genetic recombination and the cell cycle: what we have learned from chromosome dimers. *Molecular microbiology* **54**: 1151-1160.
- 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.
- Li, Y., N.K. Stewart, A.J. Berger, S. Vos, A.J. Schoeffler, J.M. Berger, B.T. Chait & M.G. Oakley, (2010) Escherichia coli condensin MukB stimulates topoisomerase IV activity by a direct physical interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 18832-18837.
- Lindow, J.C., M. Kuwano, S. Moriya & A.D. Grossman, (2002) Subcellular localization of the *Bacillus subtilis* structural maintenance of chromosomes (SMC) protein. *Molecular microbiology* **46**: 997-1009.
- Lisby, M. & R. Rothstein, (2004) DNA repair: keeping it together. *Current biology : CB* **14**: R994-996.
- Liu, L.F. & J.C. Wang, (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 7024-7027.
- 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* **11**: 139-145.
- 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.
- Lutkenhaus, J., (2007) Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. *Annual review of biochemistry* **76**: 539-562.
- Madabhushi, R. & K.J. Mariani, (2009) Actin homolog MreB affects chromosome segregation by regulating topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *Molecular cell* **33**: 171-180.
- 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. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **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.
- 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.

- Maldonado, R., J. Jimenez & J. Casades, (1994) Changes of ploidy during the *Azotobacter vinelandii* growth cycle. *Journal of bacteriology* **176**: 3911-3919.
- Maloney, E., M. Madiraju & M. Rajagopalan, (2009) Overproduction and localization of Mycobacterium tuberculosis ParA and ParB proteins. *Tuberculosis* **89 Suppl 1**: S65-69.
- Martinez, A. & R. Kolter, (1997) Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *Journal of bacteriology* **179**: 5188-5194.
- Mascarenhas, J., H. Sanchez, S. Tadesse, D. Kidane, M. Krisnamurthy, J.C. Alonso & P.L. Graumann, (2006) *Bacillus subtilis* SbcC protein plays an important role in DNA inter-strand cross-link repair. *BMC molecular biology* **7**: 20.
- Mascarenhas, J., J. Soppa, A.V. Strunnikov & P.L. Graumann, (2002) Cell cycle-dependent localization of two novel prokaryotic chromosome segregation and condensation proteins in *Bacillus subtilis* that interact with SMC protein. *The EMBO journal* **21**: 3108-3118.
- 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.
- McLeod, S.M. & R.C. Johnson, (2001) Control of transcription by nucleoid proteins. *Current opinion in microbiology* **4**: 152-159.
- Meile, J.C., R. Mercier, M. Stouf, C. Pages, J.Y. Bouet & F. Cornet, (2011) The terminal region of the *E. coli* chromosome localises at the periphery of the nucleoid. *BMC microbiology* **11**: 28.
- Melby, T.E., C.N. Ciampaglio, G. Briscoe & H.P. Erickson, (1998) The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge. *The Journal of cell biology* **142**: 1595-1604.
- Menecier, S., G. Coste, P. Servant, A. Bailone & S. Sommer, (2004) Mismatch repair ensures fidelity of replication and recombination in the radioresistant organism *Deinococcus radiodurans*. *Molecular genetics and genomics : MGG* **272**: 460-469.
- Michaelis, C., R. Ciosk & K. Nasmyth, (1997) Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* **91**: 35-45.
- Minton, K.W., (1994) DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Molecular microbiology* **13**: 9-15.
- 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.
- Mohl, D.A., J. Easter, Jr. & J.W. Gober, (2001) The chromosome partitioning protein, ParB, is required for cytokinesis in *Caulobacter crescentus*. *Molecular microbiology* **42**: 741-755.
- Mohl, D.A. & J.W. Gober, (1997) Cell cycle-dependent polar localization of chromosome partitioning proteins in *Caulobacter crescentus*. *Cell* **88**: 675-684.
- Moore, J.K. & J.E. Haber, (1996) Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **16**: 2164-2173.
- Morigen, I. Odsbu & K. Skarstad, (2009) Growth rate dependent numbers of SeqA structures organize the multiple replication forks in rapidly growing Escherichia coli. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **14**: 643-657.
- 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.

- Murray, H. & J. Errington, (2008) Dynamic control of the DNA replication initiation protein DnaA by Soj/ParA. *Cell* **135**: 74-84.
- 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.
- Nasmyth, K. & C.H. Haering, (2005) The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annual review of biochemistry* **74**: 595-648.
- 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.
- Nicolas, E., A.L. Upton, S. Uphoff, O. Henry, A. Badrinarayanan & D. Sherratt, (2014) The SMC complex MukBEF recruits topoisomerase IV to the origin of replication region in live *Escherichia coli*. *mBio* **5**: e01001-01013.
- Nielsen, H.J., Y. Li, B. Youngren, F.G. Hansen & S. Austin, (2006) Progressive segregation of the *Escherichia coli* chromosome. *Molecular microbiology* **61**: 383-393.
- Nolivos, S. & D. Sherratt, (2014) The bacterial chromosome: architecture and action of bacterial SMC and SMC-like complexes. *FEMS microbiology reviews* **38**: 380-392.
- Norais, C.A., S. Chitteni-Pattu, E.A. Wood, R.B. Inman & M.M. Cox, (2009) DdrB protein, an alternative *Deinococcus radiodurans* SSB induced by ionizing radiation. *The Journal of biological chemistry* **284**: 21402-21411.
- Okada, K., T. Iida, K. Kita-Tsukamoto & T. Honda, (2005) Vibrios commonly possess two chromosomes. *Journal of bacteriology* **187**: 752-757.
- Onogi, T., M. Yamazoe, C. Ichinose, H. Niki & S. Hiraga, (2000) Null mutation of the *dam* or *seqA* gene suppresses temperature-sensitive lethality but not hypersensitivity to novobiocin of muk null mutants. *Journal of bacteriology* **182**: 5898-5901.
- Paques, F. & J.E. Haber, (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* **63**: 349-404.
- 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* **97**: 759-774.
- Pellegrino, S., D. de Sanctis, S. McSweeney & J. Timmins, (2012a) Expression, purification and preliminary structural analysis of the coiled-coil domain of *Deinococcus radiodurans* RecN. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* **68**: 218-221.
- Pellegrino, S., J. Radzimanowski, D. de Sanctis, E. Boeri Erba, S. McSweeney & J. Timmins, (2012b) Structural and functional characterization of an SMC-like protein RecN: new insights into double-strand break repair. *Structure* **20**: 2076-2089.
- Pellegrino, S., J. Radzimanowski, S. McSweeney & J. Timmins, (2012c) Expression, purification and preliminary structural analysis of the head domain of *Deinococcus radiodurans* RecN. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* **68**: 81-84.
- Peng, H. & K.J. Mariani, (1993) Decatenation activity of topoisomerase IV during *oriC* and pBR322 DNA replication *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 8571-8575.

- Perez-Cheeks, B.A., C. Lee, R. Hayama & K.J. Mariani, (2012) A role for topoisomerase III in *Escherichia coli* chromosome segregation. *Molecular microbiology* **86**: 1007-1022.
- Pinho, M.G., M. Kjos & J.W. Veening, (2013) How to get (a)round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria. *Nature reviews. Microbiology* **11**: 601-614.
- Possoz, C., I. Junier & O. Espeli, (2012) Bacterial chromosome segregation. *Front Biosci* **17**: 1020-1034.
- 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.
- Raskin, D.M. & P.A. de Boer, (1999) Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 4971-4976.
- Rasmussen, T., R.B. Jensen & O. Skovgaard, (2007) The two chromosomes of *Vibrio cholerae* are initiated at different time points in the cell cycle. *The EMBO journal* **26**: 3124-3131.
- 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*. *The Journal of biological chemistry* **285**: 16521-16529.
- Rice, P.A., S. Yang, K. Mizuuchi & H.A. Nash, (1996) Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell* **87**: 1295-1306.
- Rocha, E.P., (2004) Order and disorder in bacterial genomes. *Current opinion in microbiology* **7**: 519-527.
- Rodley, P.D., U. Romling & B. Tumbler, (1995) A physical genome map of the *Burkholderia cepacia* type strain. *Molecular microbiology* **17**: 57-67.
- Rothfuss, H., J.C. Lara, A.K. Schmid & M.E. Lidstrom, (2006) Involvement of the S-layer proteins Hpi and SlpA in the maintenance of cell envelope integrity in *Deinococcus radiodurans* R1. *Microbiology* **152**: 2779-2787.
- Rouviere-Yaniv, J., M. Yaniv & J.E. Germond, (1979) *E. coli* DNA binding protein HU forms nucleosomelike structure with circular double-stranded DNA. *Cell* **17**: 265-274.
- Sanchez, H. & J.C. Alonso, (2005) *Bacillus subtilis* RecN binds and protects 3'-single-stranded DNA extensions in the presence of ATP. *Nucleic acids research* **33**: 2343-2350.
- 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.
- Satoh, K., H. Ohba, H. Sghaier & I. Narumi, (2006) Down-regulation of radioresistance by LexA2 in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology* **152**: 3217-3226.
- Sawitzke, J.A. & S. Austin, (2000) Suppression of chromosome segregation defects of *Escherichia coli* *muk* mutants by mutations in topoisomerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 1671-1676.
- Schneider, R., A. Travers, T. Kutateladze & G. Muskhelishvili, (1999) A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **34**: 953-964.
- Seong, G.H., E. Kobatake, K. Miura, A. Nakazawa & M. Aizawa, (2002) Direct atomic force microscopy visualization of integration host factor-induced DNA bending structure of the promoter regulatory region on the *Pseudomonas* TOL plasmid. *Biochemical and biophysical research communications* **291**: 361-366.

- Servant, P., E. Jolivet, E. Bentchikou, S. Menecier, A. Bailone & S. Sommer, (2007) The ClpPX protease is required for radioresistance and regulates cell division after gamma-irradiation in *Deinococcus radiodurans*. *Molecular microbiology* **66**: 1231-1239.
- Shashidhar, R., S.A. Kumar, H.S. Misra & J.R. Bandekar, (2010) Evaluation of the role of enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems in the radiation resistance of *Deinococcus*. *Canadian journal of microbiology* **56**: 195-201.
- Sioud, M., G. Baldacci, A.M. de Recondo & P. Forterre, (1988) Inhibitors of DNA topoisomerase II induce topological changes in an archaeobacterial plasmid *in vivo*. *Biochemical pharmacology* **37**: 1879-1880.
- 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*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **75**: 133-191.
- Spies, M., P.R. Bianco, M.S. Dillingham, N. Handa, R.J. Baskin & S.C. Kowalczykowski, (2003) A molecular throttle: the recombination hotspot chi controls DNA translocation by the RecBCD helicase. *Cell* **114**: 647-654.
- Stouf, M., J.C. Meile & F. Cornet, (2013) FtsK actively segregates sister chromosomes in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 11157-11162.
- Strunnikov, A.V., (2006) SMC complexes in bacterial chromosome condensation and segregation. *Plasmid* **55**: 135-144.
- Sullivan, N.L., K.A. Marquis & D.Z. Rudner, (2009) Recruitment of SMC by ParB-parS organizes the origin region and promotes efficient chromosome segregation. *Cell* **137**: 697-707.
- 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.
- Suwanto, A. & S. Kaplan, (1989) Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome: presence of two unique circular chromosomes. *Journal of bacteriology* **171**: 5850-5859.
- 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.
- Thanbichler, M. & L. Shapiro, (2006) MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter*. *Cell* **126**: 147-162.
- Tian, B., Z. Sun, S. Shen, H. Wang, J. Jiao, L. Wang, Y. Hu & Y. Hua, (2009) Effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* on protein oxidation. *Letters in applied microbiology* **49**: 689-694.
- Timmins, J., I. Leiros & S. McSweeney, (2007) Crystal structure and mutational study of RecOR provide insight into its mode of DNA binding. *The EMBO journal* **26**: 3260-3271.
- Toro, E. & L. Shapiro, (2010) Bacterial chromosome organization and segregation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a000349.
- Toueille, M., B. Mirabella, P. Guerin, C. Bouthier de la Tour, S. Boissard, 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. *Journal of proteomics* **75**: 2588-2600.
- Travers, A. & G. Muskhelishvili, (2005) Bacterial chromatin. *Current opinion in genetics & development* **15**: 507-514.

- 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.
- Trucksis, M., J. Michalski, Y.K. Deng & J.B. Kaper, (1998) The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 14464-14469.
- Ullsperger, C. & N.R. Cozzarelli, (1996) Contrasting enzymatic activities of topoisomerase IV and DNA gyrase from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **271**: 31549-31555.
- van Gent, D.C. & M. van der Burg, (2007) Non-homologous end-joining, a sticky affair. *Oncogene* **26**: 7731-7740.
- Varshavsky, A.J., S.A. Nedospasov, V.V. Bakayev, T.G. Bakayeva & G.P. Georgiev, (1977) Histone-like proteins in the purified *Escherichia coli* deoxyribonucleoprotein. *Nucleic acids research* **4**: 2725-2745.
- Viollier, P.H. & L. Shapiro, (2004) Spatial complexity of mechanisms controlling a bacterial cell cycle. *Current opinion in microbiology* **7**: 572-578.
- von Freiesleben, U., M.A. Krekling, F.G. Hansen & A. Lobner-Olesen, (2000) The eclipse period of *Escherichia coli*. *The EMBO journal* **19**: 6240-6248.
- Vujicic-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, J., R. Chen & D.A. Julin, (2000) A single nuclease active site of the *Escherichia coli* RecBCD enzyme catalyzes single-stranded DNA degradation in both directions. *The Journal of biological chemistry* **275**: 507-513.
- Wang, J.C., (1985) DNA topoisomerases. *Annual review of biochemistry* **54**: 665-697.
- 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.
- Weitao, T., K. Nordstrom & S. Dasgupta, (1999) Mutual suppression of *mukB* and *seqA* phenotypes might arise from their opposing influences on the *Escherichia coli* nucleoid structure. *Molecular microbiology* **34**: 157-168.
- Weitao, T., K. Nordstrom & S. Dasgupta, (2000) *Escherichia coli* cell cycle control genes affect chromosome superhelicity. *EMBO reports* **1**: 494-499.
- Weller, G.R., B. Kysela, R. Roy, L.M. Tonkin, E. Scanlan, M. Della, S.K. Devine, J.P. Day, A. Wilkinson, F. d'Adda di Fagagna, K.M. Devine, R.P. Bowater, P.A. Jeggo, S.P. Jackson & A.J. Doherty, (2002) Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science* **297**: 1686-1689.
- Wery, M., C.L. Woldringh & J. Rouviere-Yaniv, (2001) HU-GFP and DAPI co-localize on the *Escherichia coli* nucleoid. *Biochimie* **83**: 193-200.
- 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, K.W. Minton, R.D. Fleischmann, K.A. Ketchum, K.E. Nelson, S. Salzberg, H.O. Smith, J.C. Venter & C.M. Fraser, (1999) Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* **286**: 1571-1577.

- Woldringh, C.L., E. Mulder, P.G. Huls & N. Vischer, (1991) Toporegulation of bacterial division according to the nucleoid occlusion model. *Research in microbiology* **142**: 309-320.
- Wu, L.J. & J. Errington, (2012) Nucleoid occlusion and bacterial cell division. *Nature reviews. Microbiology* **10**: 8-12.
- Wu, L.J., S. Ishikawa, Y. Kawai, T. Oshima, N. Ogasawara & J. Errington, (2009) Noc protein binds to specific DNA sequences to coordinate cell division with chromosome segregation. *The EMBO journal* **28**: 1940-1952.
- 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* **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.
- Yamaichi, Y. & H. Niki, (2004) *migS*, a cis-acting site that affects bipolar positioning of *oriC* on the *Escherichia coli* chromosome. *The EMBO journal* **23**: 221-233.
- Yamanaka, K., T. Ogura, H. Niki & S. Hiraga, (1996) Identification of two new genes, *mukE* and *mukF*, involved in chromosome partitioning in *Escherichia coli*. *Molecular & general genetics* : *MGG* **250**: 241-251.
- Yamazoe, M., T. Onogi, Y. Sunako, H. Niki, K. Yamanaka, T. Ichimura & S. Hiraga, (1999) Complex formation of MukB, MukE and MukF proteins involved in chromosome partitioning in *Escherichia coli*. *The EMBO journal* **18**: 5873-5884.
- 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. Epub 2006 Sep 2027.
- Zechiedrich, E.L., A.B. Khodursky & N.R. Cozzarelli, (1997) Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes & development* **11**: 2580-2592.
- Zhang, L., Q. Yang, X. Luo, C. Fang, Q. Zhang & Y. Tang, (2007) Knockout of *crtB* or *crtI* gene blocks the carotenoid biosynthetic pathway in *Deinococcus radiodurans* R1 and influences its resistance to oxidative DNA-damaging agents due to change of free radicals scavenging ability. *Archives of microbiology* **188**: 411-419.
- Zhu, H., L.K. Wang & S. Shuman, (2005) Essential constituents of the 3'-phosphoesterase domain of bacterial DNA ligase D, a nonhomologous end-joining enzyme. *The Journal of biological chemistry* **280**: 33707-33715.
- Zimmerman, J.M. & J.R. Battista, (2005) A ring-like nucleoid is not necessary for radioresistance in the *Deinococcaceae*. *BMC microbiology* **5**: 17.

ANNEXE

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.

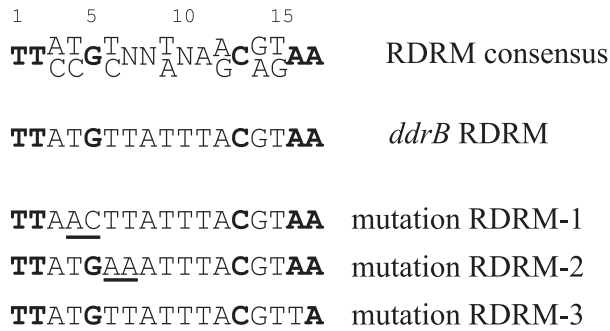
Complex regulatory networks are required for adaptation of cellular metabolism to environmental changes and to survive under stress. In *Escherichia coli*, DNA-damaging treatments result in SOS induction, a cellular process mediated by the RecA-dependent cleavage of LexA, the repressor of the SOS genes. *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 Ppr1, 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.

A



B



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

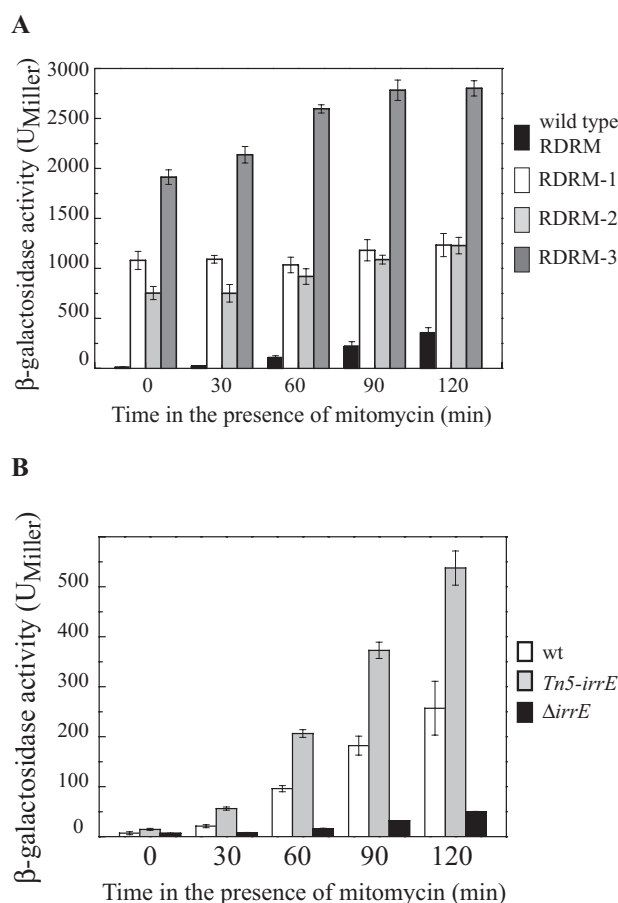


Fig. 2. Expression of translational *ddrB::lacZ* reporter gene fusion after treatment with mitomycin. *D. radiodurans* cells exposed to mitomycin C (600 ng ml⁻¹) were incubated for the indicated time periods and β -galactosidase activity was measured as described in Experimental procedures. The results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

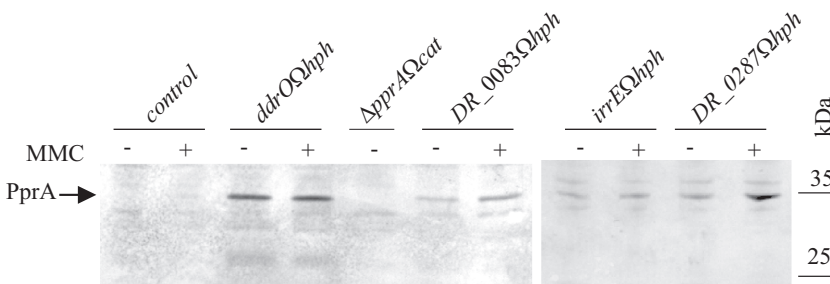


Fig. 3. Expression of PprA in different mutants identified by screening of a transposon library on X-gal plates. Bacteria were grown on TGY plates with hygromycin in the presence (80 ng ml⁻¹) or absence of MMC for 3 days. Cell extracts were subjected to SDS-PAGE and analyzed by Western blot with anti-PprA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

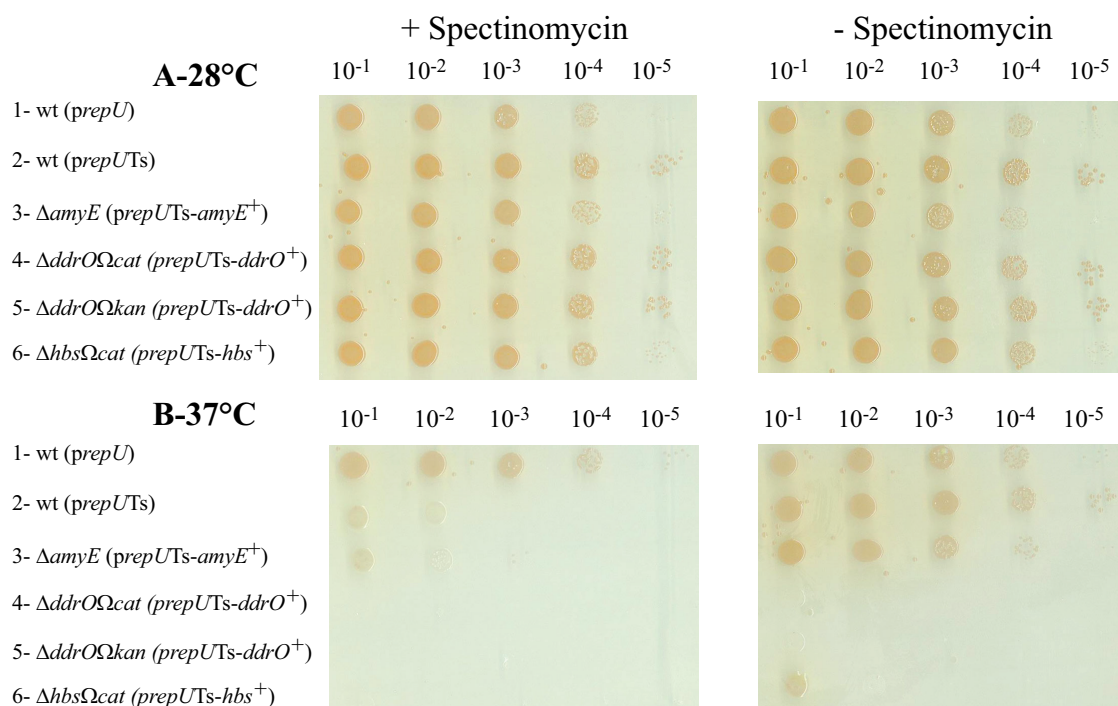


Fig. 4. *ddrO* is essential for *D. radiodurans* viability. Strains were grown in liquid medium with spectinomycin at 28°C. Sequential dilutions of cells were spotted on TGY plates in the presence or absence of spectinomycin at 28°C (A) or 37°C (B). Lane 1: strain GY13785 containing non-thermosensitive 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,

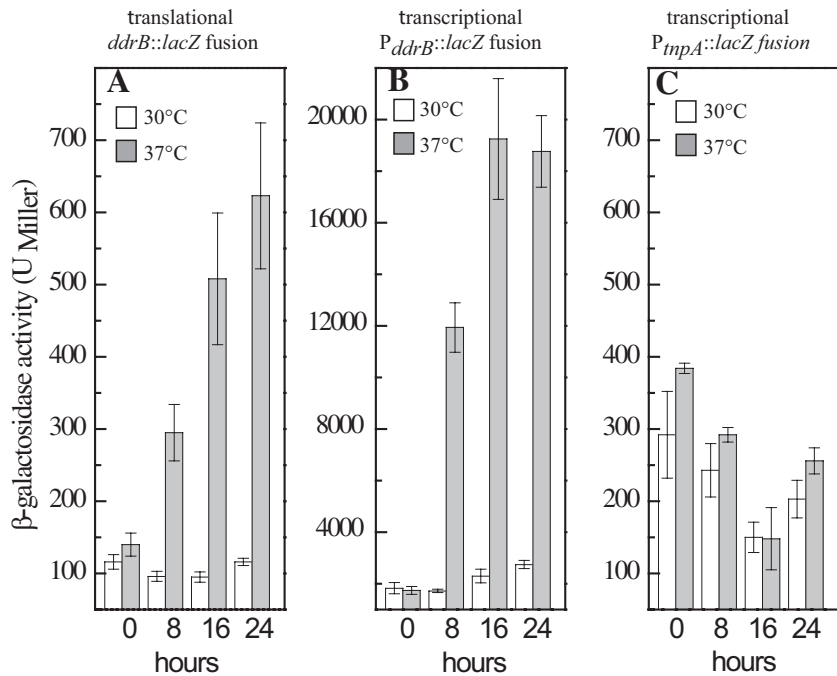


Fig. 5. Effect of DdrO depletion on expression of translational and transcriptional *ddrB::lacZ* reporter fusions. Cells in exponential growth cultivated at 30°C in media supplemented with spectinomycin were harvested by centrifugation, diluted in antibiotic-free medium and incubated at 30°C (white bars) 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

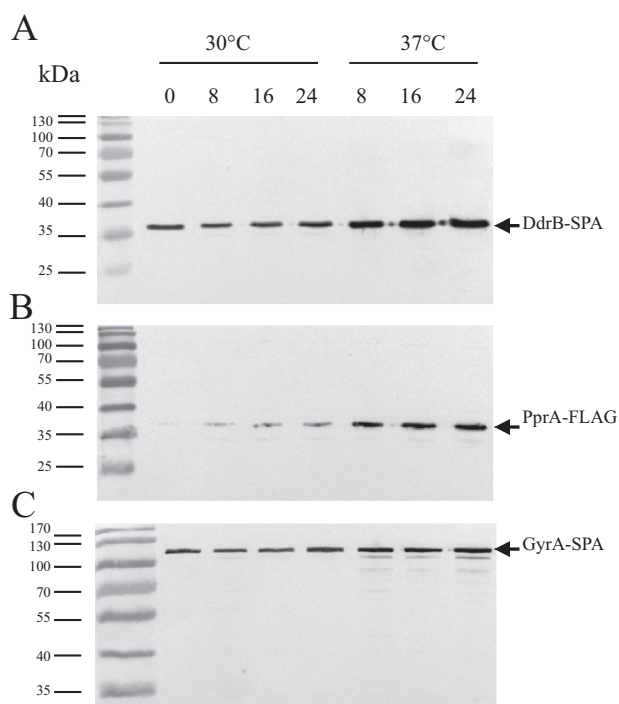


Fig. 6. Effect of DdrO depletion on the cell concentration of DdrB, PprA and GyrA. Bacteria cultivated at 30°C in medium supplemented with spectinomycin to $A_{650nm} = 0.3$ were harvested by centrifugation, diluted in antibiotic-free medium and incubated at 30°C or at 37°C during the indicated periods (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

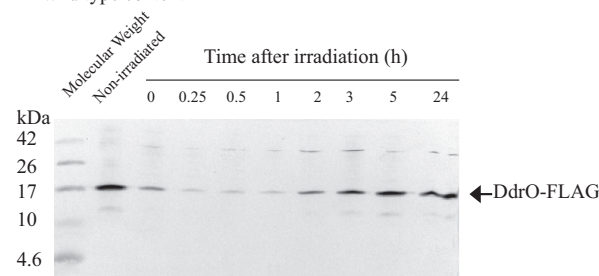
two to four highly condensed dots of DAPI staining. In all cells, the second septum required to form a tetrad is abortive or not visible.

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

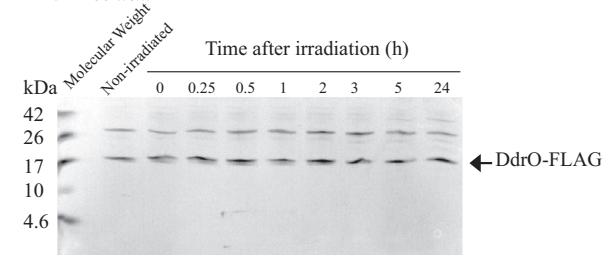


Fig. 7. Decreased DdrO cell concentration after gamma irradiation is dependent on the presence of IrrE. *D. radiodurans* cells extracts from unirradiated or irradiated cells exposed to 3.8 kGy γ -irradiation and incubated during the indicated periods (hours) were subjected to 16% SDS-PAGE and analysed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

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

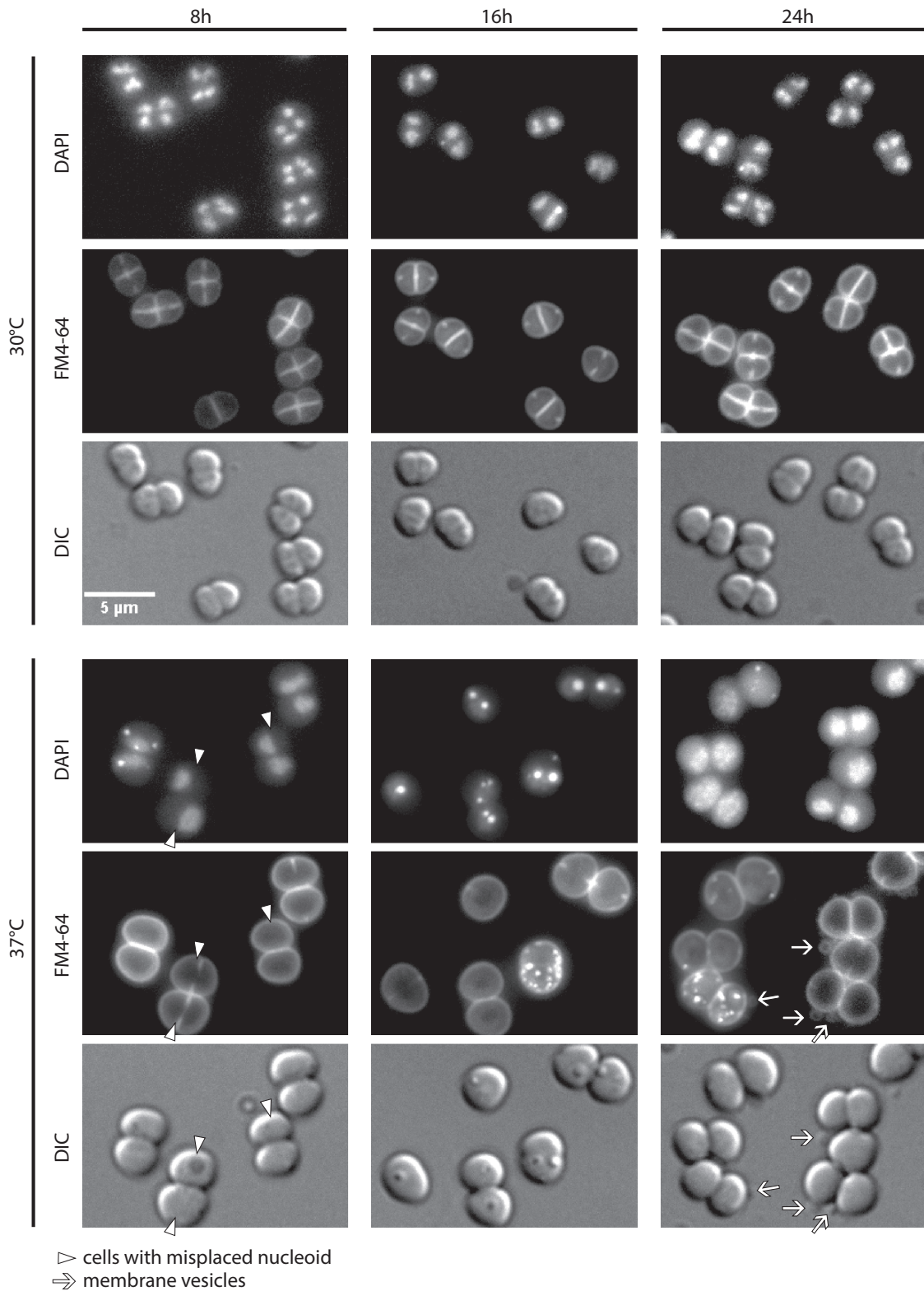


Fig. 8. Effect of *ddrO* depletion on *D. radiodurans*. Cells [GY 14165 [Δ *ddrO* Ω *kan/p11891*(*prepUTs::ddrO*⁺)]] in exponential growth phase cultivated at 30°C in medium supplemented with spectinomycin were harvested by centrifugation, diluted in antibiotic-free medium and incubated at 30°C (upper 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).

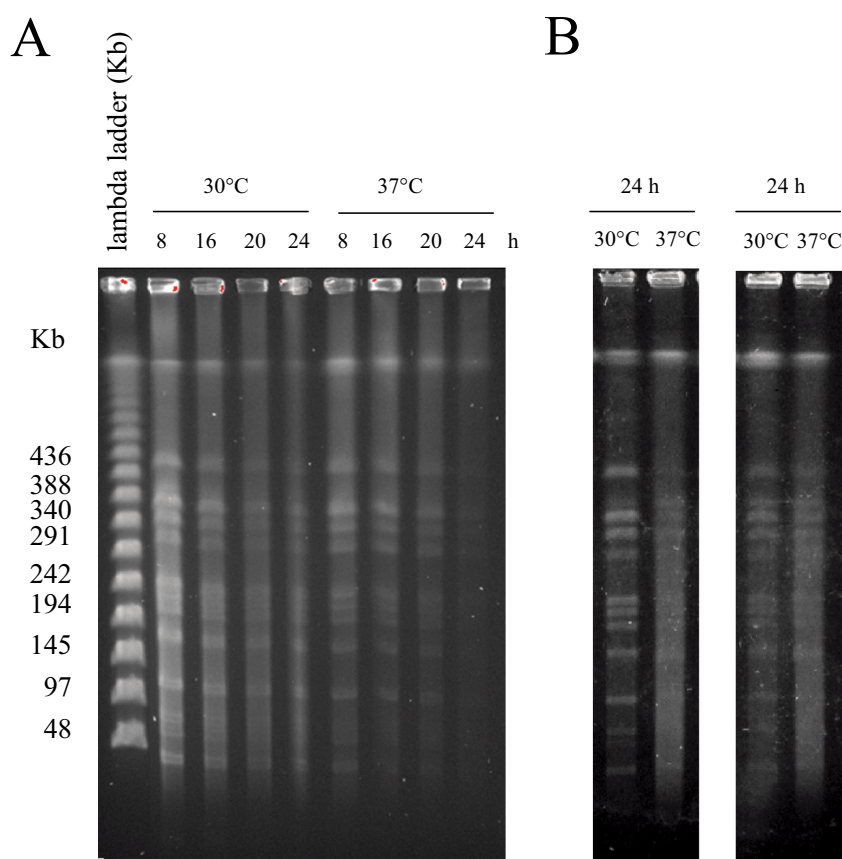


Fig. 9. DNA degradation in DdrO depleted cells. Cells {GY 14165 [$\Delta ddrO\Omega kan/p11891(prepUTs::ddrO^+)$]} in exponential growth phase cultivated at 30°C in medium supplemented with spectinomycin were harvested by centrifugation, diluted in antibiotic-free medium, and incubated at 30°C or at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

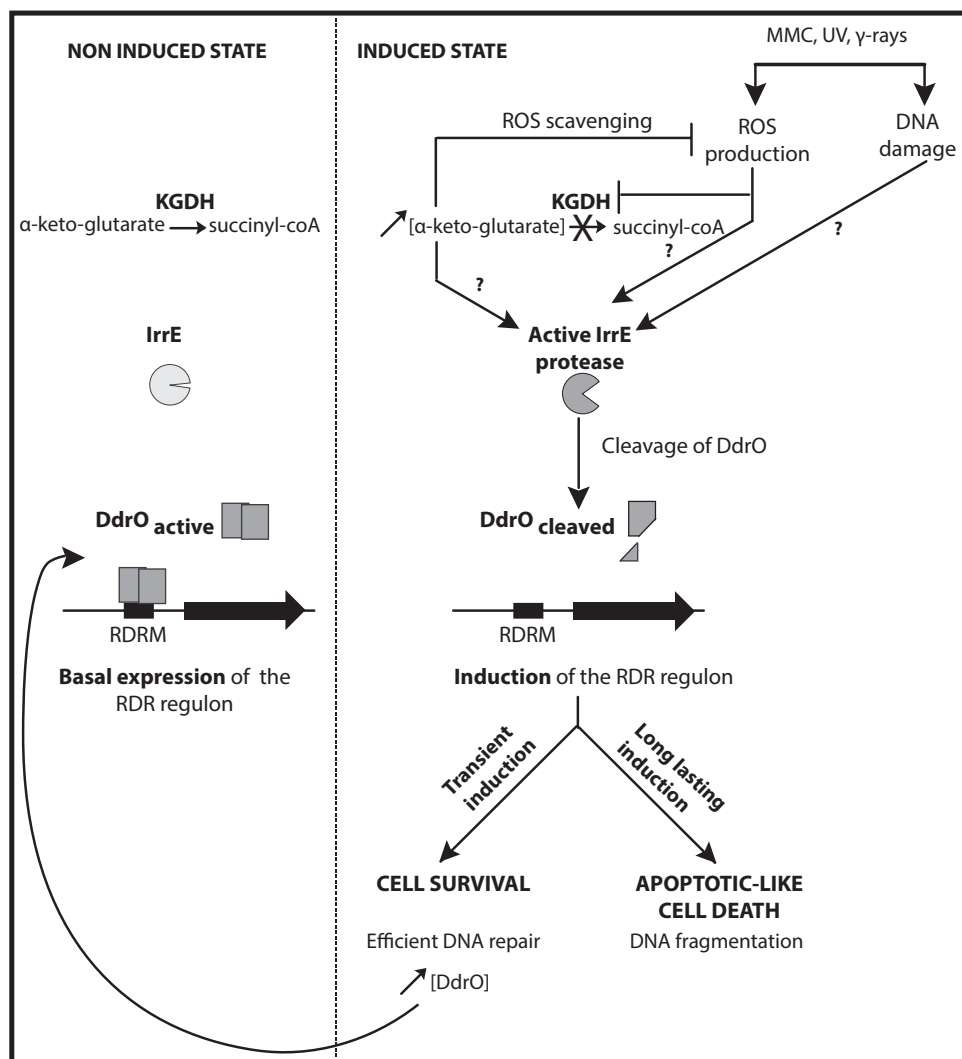


Fig. 10. Model for the regulation of the RDR regulon.

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	<i>ΔpprAΩcat</i>	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	<i>ΔamyEΩPtufA::lacI-kan/p13849 (prepUTs::amyE)</i>	Nguyen <i>et al.</i> (2009)
GY13785	R1/p11554	This work
GY13795	<i>ΔhbsΩcat/p13863 (prepUTs::hbs)</i>	Nguyen <i>et al.</i> (2009)
GY14125	Non homogenotized <i>ΔddrOΩcat</i>	This work
GY14126	Non homogenotized <i>ΔddrOΩkan</i>	This work
GY14127	<i>ΔirrEΩkan</i>	This work
GY14164	<i>ΔddrOΩcat/p11891 (prepUTs::ddrO⁺)</i>	This work
GY14165	<i>ΔddrOΩkan/p11891 (prepUTs::ddrO⁺)</i>	This work
GY14166	<i>ddrOΩhph/p11891 (prepUTs::ddrO⁺)</i>	This work
GY14310	<i>Δ(ISDra2F)ΩtetAΩ(P_{mpA}::lacZΩcat)</i>	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	<i>ΔcrtIΩ(P_{ddrB}::lacZΩcat)</i> transcriptional fusion	This work
GY15512	<i>ΔcrtIΩ(ddrB::lacZΩcat)</i> translational fusion	This work
GY15515	<i>ΔirrEΩhphΔcrtIΩ(ddrB::lacZΩcat)</i> translational fusion	This work
GY15570	<i>pprA::flagΩcat ΔddrOΩkan/p11891 (prepUTs::ddrO⁺)</i>	This work
GY15572	<i>gyrA::spaΩcat ΔddrOΩkan/p11891 (prepUTs::ddrO⁺)</i>	This work
GY15574	<i>ddrB::spaΩcat ΔddrOΩkan/p11891 (prepUTs::ddrO⁺)</i>	This work
GY15576	<i>ΔcrtIΩ(ddrB::lacZΩcat)</i> (RDRM-1 mutation) translational fusion	This work
GY15577	<i>ΔcrtIΩ(ddrB::lacZΩcat)</i> (RDRM-2 mutation) translational fusion	This work
GY15579	<i>ΔcrtIΩ(ddrB::lacZΩcat)</i> (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	<i>ΔddrOΩkan/p11891 (prepUTs::ddrO⁺) ΔcrtIΩ(P_{ddrB}::lacZΩcat)</i> transcriptional fusion	This work
GY16476	<i>ΔddrOΩkan/p11891 (prepUTs::ddrO⁺) ΔcrtIΩ(ddrB::lacZΩcat)</i> translational fusion	This work
GY16478	<i>ΔddrOΩkan/p11891 (prepUTs::ddrO⁺) ΔcrtIΩ(P_{gyrA}::lacZΩcat)</i> transcriptional fusion	This work
GY16480	<i>ΔddrOΩkan/p11891 (prepUTs::ddrO⁺) Δ(ISDra2F)ΩtetAΩ(P_{mpA}::lacZΩcat)</i> 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 *ΔddrOΩcat*, *ΔddrOΩkan*, *ΔddrOΩhph*, *ΔcrtIΩ(P_{ddrB}::lacZΩcat)*, *ΔcrtIΩ(P_{gyrA}::lacZΩcat)*, *ΔirrEΩkan*, *ΔirrEΩhph*, *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>Acc651/BglII</i> + PCR fragment containing P _{<i>ddrB</i>} (transcriptional fusion)	This work
p13033	p13027 <i>Acc651/NcoI</i> + PCR fragment containing P _{<i>ddrB</i>} (translational fusion)	This work
p13036	p13025 <i>Acc651/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*. 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.

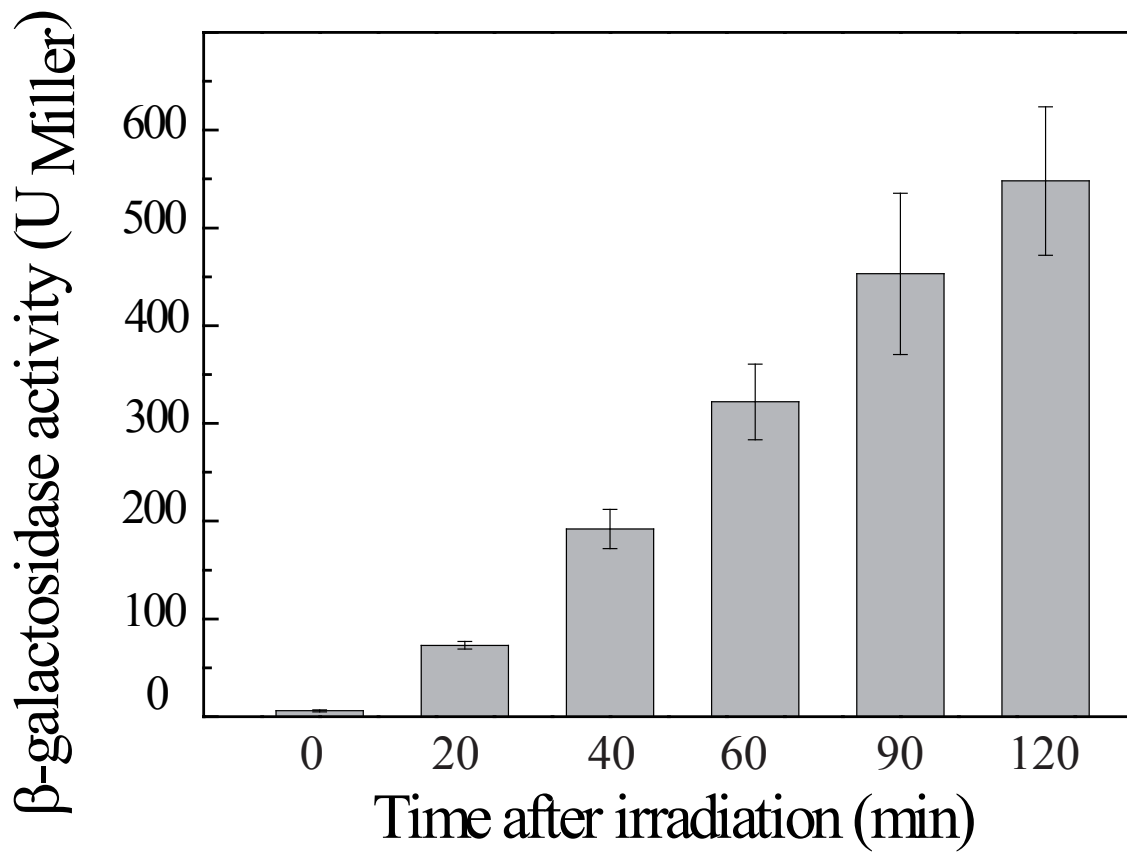


Fig. S1: Expression of a *ddrB::lacZ* reporter translational fusion after γ -irradiation.

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.

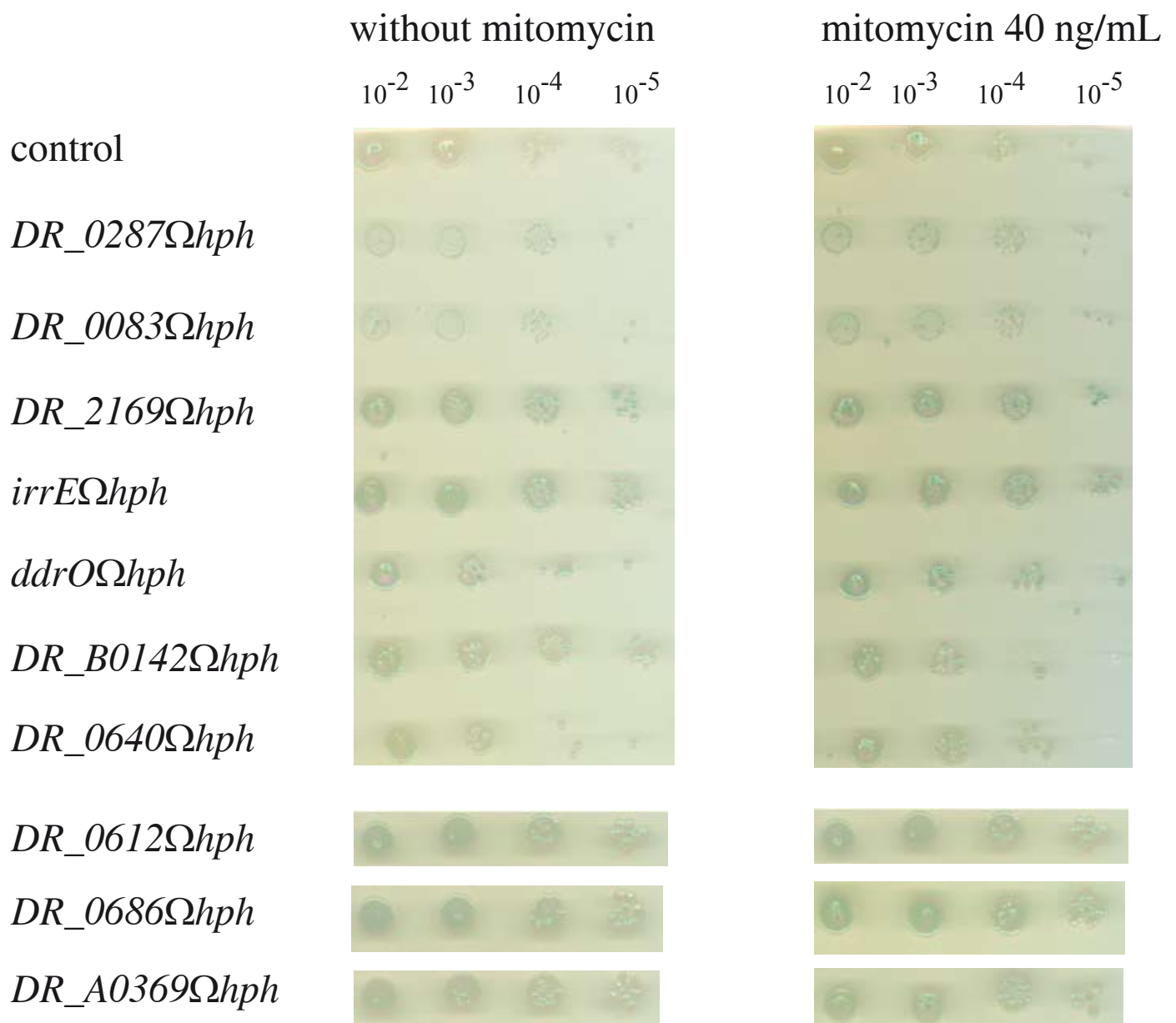


Fig. S2: β -galactosidase expression from a *ddrB::lacZ* translational fusion in different mutants identified by screening of a transposon library on X-gal plates.

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.

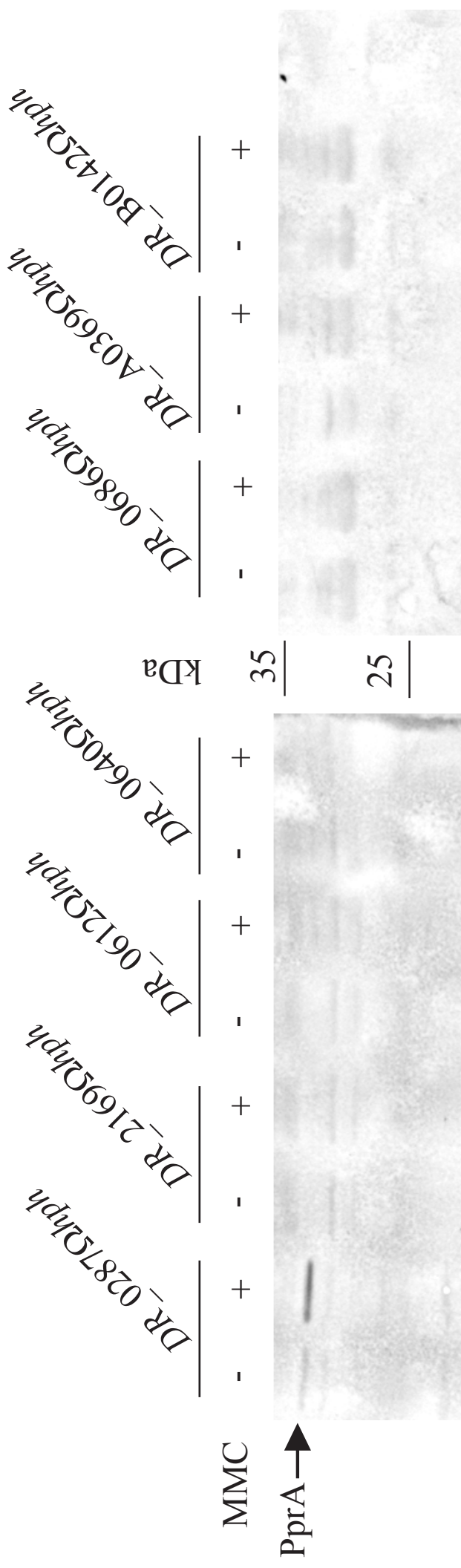


Fig. S3: Expression of PprA in different mutants identified by screening of a transposon library on X-gal plates.

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.

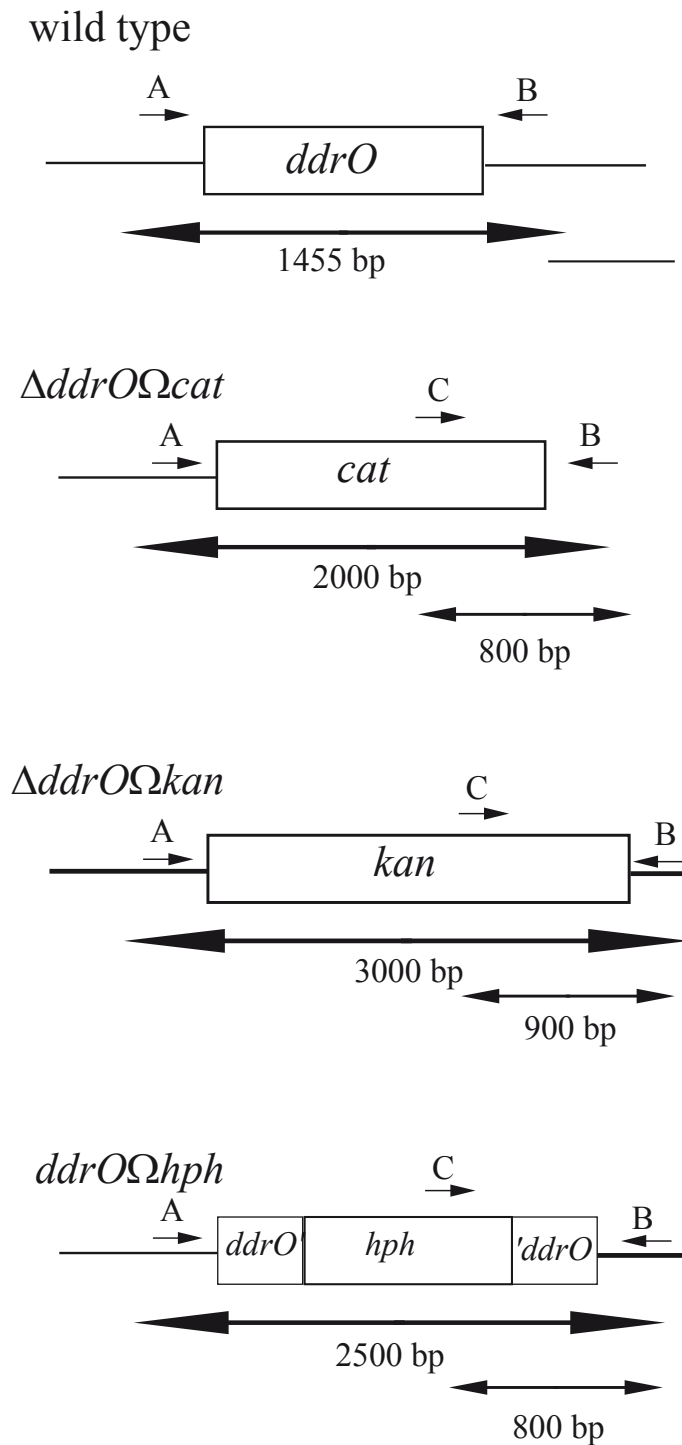
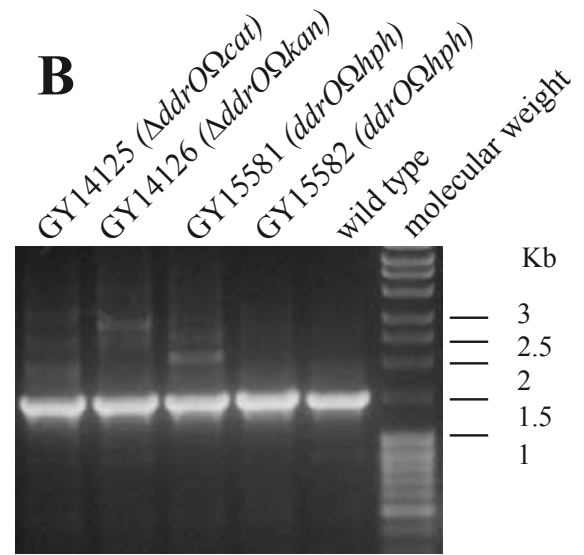
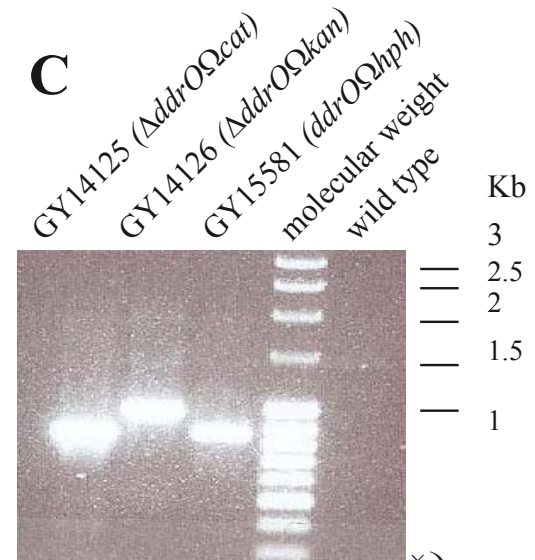
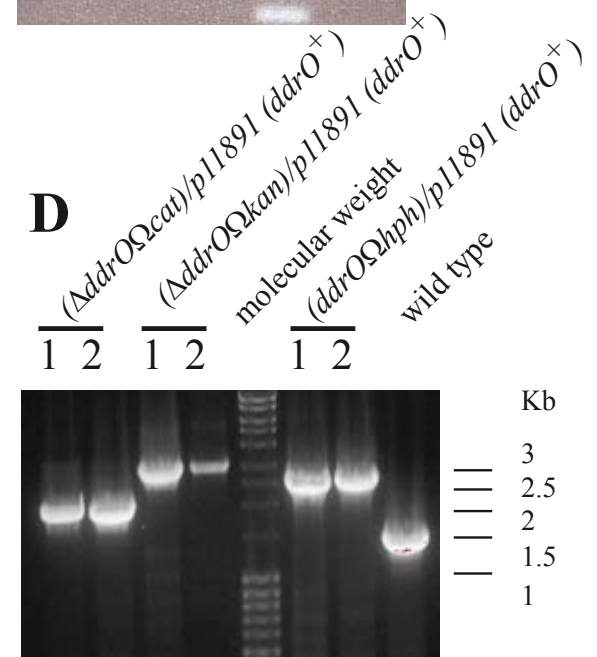
A**B****C****D**

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

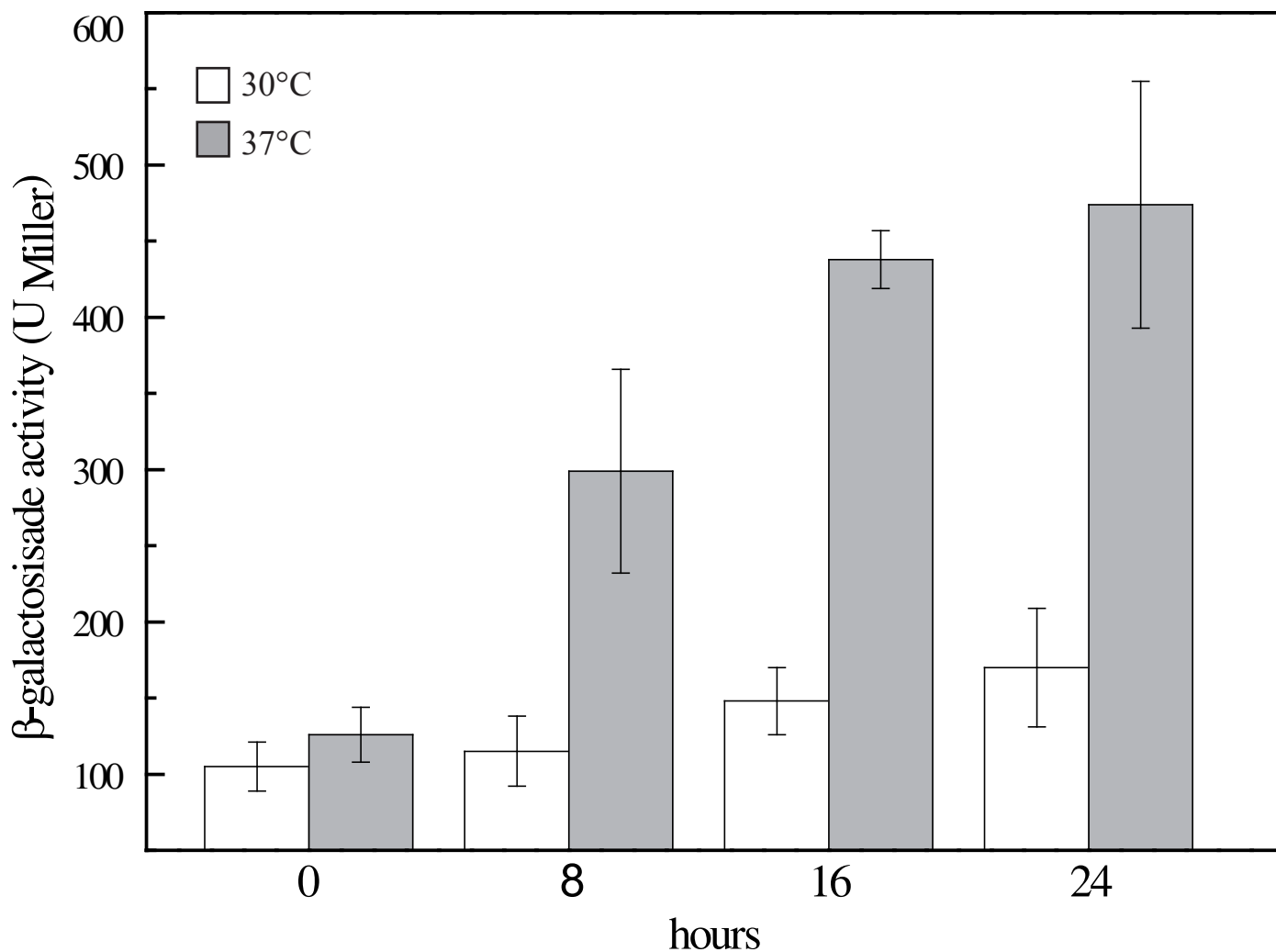


Fig. S5: Expression of a $P_{gyrA}::lacZ$ reporter transcriptional fusion after DdrO depletion

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.

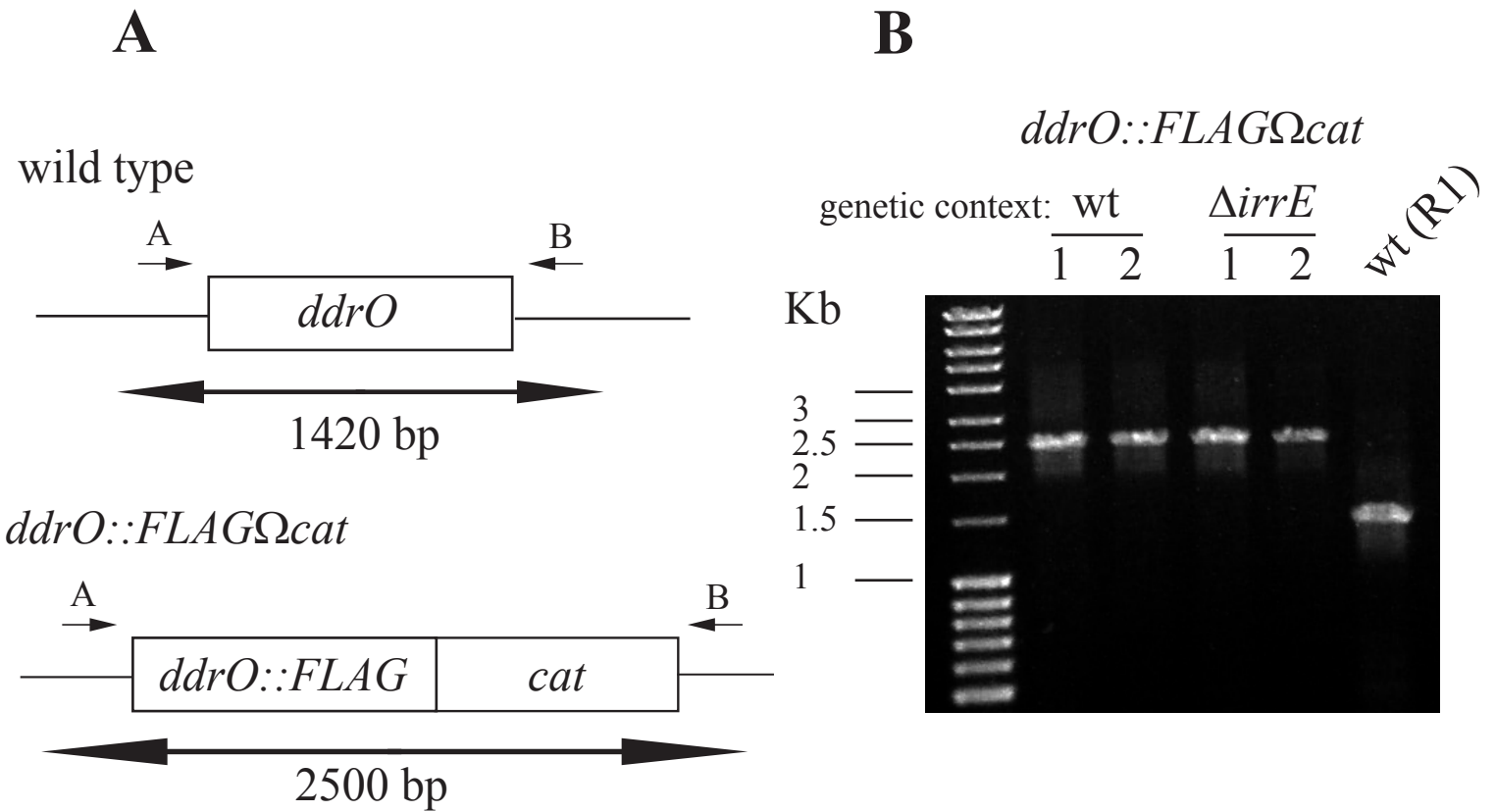


Fig. S6: Schematic representation and test of allelic replacements of $ddrO^+$ by *ddro::flag* allele.

(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.