



HAL
open science

Régulation de la réponse à divers stress et réparation des cassures double brin de l'ADN chez la bactérie *Deinococcus radiodurans*

Laura Meyer

► **To cite this version:**

Laura Meyer. Régulation de la réponse à divers stress et réparation des cassures double brin de l'ADN chez la bactérie *Deinococcus radiodurans*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS422 . tel-02145221v2

HAL Id: tel-02145221

<https://theses.hal.science/tel-02145221v2>

Submitted on 2 Jun 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.

Régulation de la réponse à divers stress et réparation des cassures double brin de l'ADN chez la bactérie *Deinococcus radiodurans*.

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud
dans le laboratoire: Radiorésistance des bactéries et des archées

École doctorale n°577
Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 7 décembre 2018, par

Laura Meyer

Composition du Jury :

Stéphanie Bury-Moné Professeure, Université Paris-Saclay (Orsay)	Présidente
Arjan De Groot Chercheur, CEA (Saint-Paul-lez-Durance)	Rapporteur
Guennadi Sezonov Professeur, Sorbonne Université (Paris)	Rapporteur
Corinne Cassier Chauvat Directeur de recherche, CNRS/CEA (Saclay)	Examinatrice
Olivier Espéli Directeur de recherche, Collège de France (Paris)	Examineur
Pascale Servant Maître de conférences, Université Paris-Saclay (Orsay)	Directrice de thèse

Je remercie

En premier lieu, je voudrais remercier l'ensemble des membres du jury : Stéphanie Bury-Moné, Arjan De Groot, Guennadi Sezonov, Corinne Cassier Chauvat et Olivier Espéli, qui en ayant accepté d'apporter leurs regards critiques sur mon travail, me font l'honneur de prendre part aux ultimes étapes de cette thèse.

Fabrice Confalonieri, le chef et mon 1^{er} directeur de thèse officiel, qui impressionne la plupart des étudiants, mais en étant dans son laboratoire, je me suis rendue compte qu'il était une personne accessible, prodiguant des conseils judicieux et donnant beaucoup de son temps. J'ai apprécié sa rigueur scientifique. Je tiens à le remercier pour son investissement dans la préparation de mon concours à l'école doctorale et pour son soutien pendant ma thèse lorsque j'ai rencontré des difficultés suite à la publication par une équipe concurrente de la majorité de mon sujet de thèse et suite à l'annonce de la mutation de Cécile Pasternak, mon encadrante.

Cécile Pasternak, ma directrice de thèse officieuse, je souhaite tout d'abord la remercier de m'avoir accueillie et encadrée en M2 pour débiter nos travaux sur DdrI. Ensemble, nous sommes parties de rien avec ce sujet, nous avons réussi à dompter le mutant ΔddrI qui n'est pas tous les jours facile à manipuler. C'est avec elle que j'ai préparé et réussi le premier concours déterminant de ma vie, celui de l'école doctorale. C'est aussi avec elle que j'ai affronté ma première épreuve difficile du métier de chercheur qui était, la publication de la quasi-totalité de nos résultats par une équipe concurrente, 8 mois après le début de ma thèse. Mais c'est aussi ensemble que nous avons rebondi, essayé de sauver nos résultats, de reconstruire quelque chose, sans jamais baisser les bras ni abandonner notre sujet DdrI, auquel nous étions profondément attachées. Le destin a fait que tu as eu la possibilité de rejoindre ta famille à Limoges pendant ma 2^{ième} année de thèse, mais même si j'ai été déstabilisée au début, nous avons réussi, même séparées par 400 km, à continuer nos recherches et à publier un article ! Je pense que nous pouvons être très fières d'avoir relevé ce défi. Je voulais également te remercier pour le temps que tu as consacré à corriger ma thèse. A tes côtés, j'ai beaucoup appris et je te souhaite beaucoup de réussite et de bonheur dans ta nouvelle vie.

Pascale Servant, ma 2^{ième} directrice de thèse, eh oui j'ai eu la chance d'avoir 2 directeurs de thèse. Je la remercie d'avoir pris le relais et d'avoir tout mis en œuvre pour que nous puissions publier nos résultats. Je voudrais également la remercier pour sa bienveillance, ses conseils judicieux et pour m'avoir si bien accompagnée sur le plan scientifique et humain pendant ces années. Pascale a toujours été là pour me reconforter et me soutenir dans les moments difficiles, même avant qu'elle ne devienne ma directrice de thèse. Je la remercie aussi pour m'avoir initiée à la réparation de l'ADN et m'avoir associée au sujet sur RecN, qui était éloigné de mon sujet de thèse initial, mais que j'ai finalement beaucoup apprécié. Je la remercie aussi de m'avoir conseillée d'encadrer des stagiaires ce qui fut une bonne expérience que je renouvellerai volontiers. Encore merci de m'avoir soutenue pour mon premier séminaire en anglais, tant redouté au départ, mais qui c'est finalement bien passé ! Enfin je la remercie pour s'être énormément investie dans la correction et les ultimes relectures de ma thèse.

Je tenais également à remercier chaleureusement Suzanne Sommer, une passionnée de D. radiodurans et de la réparation de l'ADN, qui a été quasiment une 3^{ième} directrice de thèse pour moi lors de ma dernière année de thèse. Suzanne s'est énormément impliquée dans la réflexion et la rédaction des articles DdrI et RecN et dans la correction de ma thèse. J'ai beaucoup aimé travailler à ses côtés, assister aux réunions d'articles dans son bureau qui duraient entre 3 et 4h mais où le temps semblait s'arrêter...où j'ai beaucoup appris, où chacun exprimait son opinion et ses idées et où ensemble nous assemblions les résultats les uns avec les autres, construisions des modèles, réfléchissions aux futures manipulations et qui après plusieurs mois de manipulations et de réflexion...donnent naissance à un article ! Tous ces moments sont sans aucun doute, les meilleurs moments que j'ai passés du point de vue scientifique et qui me manqueront. Je la remercie également pour ses encouragements et ses félicitations au quotidien qui sont si importants lors de la dernière année de thèse et pour m'avoir accompagnée et soutenue jusque tard dans la nuit pour la manipulation de synthèse d'ADN, je pense que je n'oublierai jamais cette manipulation !

Un grand merci encore à :

Adriana Bailone pour ses conseils avisés lors des réunions de labo et l'écriture des articles. Adriana est un exemple pour nous les jeunes car même en étant à la retraite elle est toujours autant investie et passionnée par la recherche.

Esma Bentchikou, la nouvelle maîtresse de conf recrutée au labo qui revient aux sources ! Merci pour ta bonne humeur et ta joie de vivre, si importantes au quotidien.

Claire Bouthier de la Tour, pour tout le temps qu'elle m'a consacré que ce soit pour me former à la microscopie, la purification de DdrI, les retards sur gel, les irradiations à 7h30 du matin ☺ mais aussi pour m'avoir apportée ses idées judicieuses. J'ai beaucoup aimé les moments où nous étions un peu comme dans une bulle et que où échangeons, essayions de comprendre les choses complexes de la Science ! Mais je ne peux évidemment pas citer Claire sans parler de nos pauses café du matin, où nous refaisons le monde, nous détendons, rigolons beaucoup et durant lesquelles elle m'a beaucoup soutenue et écoutée. Ces pauses-café (mais sans café !) m'étaient indispensables pour bien commencer la journée et humainement c'est l'une des choses qui me manquera le plus quand je quitterai le labo !

Geneviève Coste, pour ses conseils techniques à la paillasse, sa disponibilité à rendre service, et pour son aide pour les manip de transfo du mutant Δ ddrI qui n'ont pas été une mince affaire et surtout pour sa grande écoute et son soutien au quotidien. J'ai été très contente de partager le bureau avec elle et j'ai découvert une personne très humaine et qui donne beaucoup de sa personne pour obtenir des résultats avec une grande rigueur.

Murielle Dutertre et Aurore Gorlas pour leur bienveillance et leurs conseils pour l'extraction des ARN.

Martine Porteron, notre nouvelle retraitée, la « pro » de la protéine et des retards sur gels, merci pour tous tes conseils pour la purification de DdrI et les retards sur gels qui m'ont donné du fil à retordre. Merci également pour ta joie de vivre, qui a mis l'ambiance au labo !

Yvan Zivanovic pour avoir développé un site web pour l'analyse du génome de *D. radiodurans*, qui nous facilite la vie au quotidien au labo et qui m'a beaucoup aidée pour effectuer les prédictions in silico des cibles potentielles de DdrI.

Nicolas, la relève ! Bon courage pour ces 2 prochaines années de thèse, je compte sur toi pour élucider les secrets de DdrO.

Roxane Michaud, une étudiante en BTS que j'ai encadré durant 14 semaines et qui a apporté sa pierre à l'édifice à l'article DdrI.

Les différents stagiaires qui sont passés au labo (Fatma, Alexandre alias « tu passeras dans mon bureau ») qui ont égaillé mes journées.

Corinne Chauvat et Fabienne Malagnac, mes 2 tutrices de thèse pour leur bienveillance lors de mes comités de thèse.

Les supers mamans du bout du couloir, avec qui j'ai beaucoup rigolé et plaisanté, qui ont toujours été là pour me soutenir et m'écouter et qui se sont toujours préoccupées de mon bien être.

Marie-Hélène Sarda et Martine Denis, pour leur aide administrative et leur bonne humeur qui font du bien.

Ecrire ces remerciements clôture l'écriture de ma thèse, la fin de 3 ans et demi de travail, de joie, de doute, d'échec, de réussite, de fatigue, de récompense, d'intensité, de rencontres et le début d'une nouvelle vie. Ces années sont passées bien plus vite que je ne l'aurais imaginé et ont été un véritable ascenseur émotionnel, j'ai aimé avoir cette petite dose d'adrénaline avant de connaître les résultats d'une expérience. Même si le début de ma thèse a été compliqué, je suis très fière et contente de la manière dont elle se termine.

SOMMAIRE

Liste des figures et tableaux	5
Liste des principales abréviations	9
Résumé	11
Summary	13
INTRODUCTION.....	15
1°) Deinococcus radiodurans, l'un des organismes les plus radiorésistants connus à ce jour.....	17
A- Présentation de la bactérie Deinococcus radiodurans.....	17
B- Organisation de son génome	19
C- Morphologie et division cellulaire	20
D- D. radiodurans est une bactérie naturellement transformable	26
E- Une résistance exceptionnelle aux agents génotoxiques	29
2°) Les mécanismes impliqués dans la radiorésistance.....	33
A- Protection contre le stress oxydant.....	35
1°) Détoxification des ROS par les catalases, superoxydes dismutases et peroxydases	35
2°) Les complexes avec les ions manganèse	36
3°) Les caroténoïdes.....	38
4°) Les protéines Dps.....	38
5°) Le métabolisme	39
6°) Elimination des macromolécules oxydées	39
B- Réparation efficace des lésions de l'ADN	41
1°) Réparation par excision de base : BER	42
2°) Réparation par excision de nucléotides: NER.....	43
3°) Le système de réparation des mésappariements.....	46
4°) La recombinaison homologue	48
5°) Le SSA (Single Strand Annealing)	51
6°) L'ESDSA, un mécanisme original chez D. radiodurans	53
7°) Le NHEJ chez D. radiodurans ?.....	54
C- Le rôle des protéines spécifiques aux Deinococcaceae.....	56
1°) La protéine PprA	57
2°) La protéine DdrA	62
3°) La protéine DdrB.....	62
4°) La protéine DdrC.....	64
D- La structure compacte du nucléoïde	66

3°) Régulation de la réponse au stress chez D. radiodurans	71
A- Les régulateurs transcriptionnels.....	71
1°) LexA1 et LexA2: une réponse SOS chez D. radiodurans ?.....	71
2°) OxyR et OxyR ₂ , deux régulateurs transcriptionnels senseurs du stress oxydant	72
3°) Les protéines Dr2539 et Dr0865 sont impliquées dans l'homéostasie des ions Mn ²⁺ /Fe ²⁺	74
4°) Le répresseur transcriptionnel DdrO et la métalloprotéase IrrE.....	76
6°) IrrI (Dr0171).....	79
7°) Les facteurs sigma alternatifs chez D. radiodurans	80
B- Les systèmes à deux composants.....	81
1°) Le régulateur de réponse DrRRA.....	82
2°) Le système à deux composants RadS/RadR.....	83
C- Régulation post-transcriptionnelle	84
1°) Les petits ARN non codants.....	84
2°) PprM.....	84
D- L'implication des sérines thréonines kinases	86

Chapitre 1: DdrI, un régulateur transcriptionnel de la famille CRP/FNR, joue un rôle majeur dans l'adaptation au stress chez D. radiodurans. 87

Problématique.....	89
1°) Les régulateurs transcriptionnels de la famille CRP/FNR.....	93
A- Caractéristiques générales des protéines de la famille CRP/FNR.....	93
B- Les protéines de la sous-famille CRP	98
1°) La CRP ^{Ec} de E. coli	98
2°) Exemples d'autres membres de la sous-famille CRP.....	105
Article 1: DdrI, a cAMP Receptor Protein Family Member, Acts as a Major Regulator for Adaptation of Deinococcus radiodurans to Various Stresses.	113
Conclusions et perspectives	115

Chapitre 2: L'absence de la protéine RecN, supprime la sensibilité aux agents endommageant l'ADN du mutant ΔpprA chez la bactérie radiorésistante Deinococcus radiodurans..... 125

Problématique.....	127
1°) Les contraintes topologiques de l'ADN et le rôle des ADN topoisomérases	129
2°) Les protéines de la famille SMC	137
A- Caractéristiques générales des protéines de la famille SMC	137
B- Les protéines de la sous-famille SMC/MukB	138
1°) Structure des protéines SMC/MukB.....	138

2°) Le rôle des protéines SMC/MukB.....	140
C- Les protéines de la sous-famille SbcC.....	143
D- Les protéines de la sous-famille RecN.....	146
E- Les protéines SMC chez D. radiodurans	149
1°) La protéine SMC	149
2°) La protéine SbcC.....	149
3°) La protéine RecN	151
Article 2 (en préparation): The absence of the RecN protein suppresses the cellular defects of Deinococcus radiodurans irradiated cells devoid of the PprA protein by limiting recombinational repair of DNA lesions.....	155
Résultats complémentaires	157
Conclusions et perspectives	161
Références bibliographiques	169
ANNEXE: Article 3: In vivo and in vitro characterization of DdrC, a DNA damage response protein in Deinococcus radiodurans bacterium.	199

Liste des figures et tableaux:

Figure 1 : Arbre phylogénétique établi par comparaison des facteurs sigma σ^{70}	18
Figure 2 : Structure de l'enveloppe cellulaire de <i>D. radiodurans</i> observée par microscopie électronique	20
Figure 3 : La division cellulaire chez <i>D. radiodurans</i>	21
Figure 4 : Représentation schématique des différents constituants du divisome chez <i>E. coli</i>	22
Figure 5 : Les systèmes Min et NO décrits chez <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i>	23
Figure 6 : Modèle d'internalisation de l'ADN extracellulaire chez la bactérie à Gram positif (<i>Bacillus subtilis</i>) et à Gram négatif (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>).....	27
Figure 7 : Modèle proposé chez <i>D. radiodurans</i> , pour reconstituer un ADN plasmidique circulaire double brin lors de la transformation par de l'ADN plasmidique	28
Figure 8 : Comparaison des courbes de survie après exposition au rayonnement γ des bactéries <i>E. coli</i> , <i>D. radiodurans</i> et des archées radiorésistantes <i>Pyrococcus furiosus</i> , <i>Thermococcus gammatolerans</i> et <i>Halobacterium</i>	29
Figure 9 : Comparaison des courbes de survie après exposition au rayonnement UVC des bactéries <i>D. radiodurans</i> et <i>E. coli</i>	30
Figure 10 : Courbes de survie des bactéries <i>D. radiodurans</i> et <i>E. coli</i> en fonction du nombre de jours de dessiccation	30
Figure 11 : Comparaison des courbes de survie des bactéries <i>D. radiodurans</i> et <i>E. coli</i> après traitement des cellules pendant 60 min à des concentrations différentes de peroxyde d'hydrogène.....	31
Figure 12 : Les mécanismes mis en place par <i>D. radiodurans</i> pour détoxifier la cellule des ROS générés par les rayonnements γ	34
Figure 13 : Comparaison des activités des catalases et des superoxydes dismutases chez <i>D. radiodurans</i> et <i>E. coli</i>	36
Figure 14 : L'ultrafiltrat (dépourvu de protéines) de <i>D. radiodurans</i> protège les protéines de <i>E. coli</i> de la carbonylation. L'ultrafiltrat de <i>Pseudomonas putida</i> (PP), <i>E. coli</i> (EC), <i>Thermus thermophilus</i> (TT) ou <i>D. radiodurans</i> (DR) est incubé avec des protéines purifiées de <i>E. coli</i> , qui sont par la suite, exposées à des doses de 0, 2, 4 ou 8 kGy de rayonnement γ	37
Figure 15 : Cinétique de reconstitution du génome de <i>D. radiodurans</i> après exposition des cellules au rayonnement γ (6.8 kGy), visualisée par le suivi du profil de digestion de l'ADN par NotI par électrophorèse en champ pulsé.....	41
Figure 16 : Mécanisme de réparation par excision de base (BER).....	43
Figure 17: Mécanisme de réparation des dimères de thymine par excision de nucléotides chez <i>E. coli</i> : voie UvrABC	44
Figure 18: Mécanisme de réparation des dimères de thymine par excision de nucléotides chez <i>S. pombe</i> : voie UVDE.....	45
Figure 19: Système de réparation des mésappariements décrit chez <i>E. coli</i>	47
Figure 20: Voies enzymatiques impliquées dans la maturation des extrémités d'ADN ..	49
Figure 21: La recombinaison homologue chez <i>E. coli</i>	51
Figure 22: Principe du mécanisme de réparation de l'ADN par SSA (single strand annealing).....	52

Figure 23: Principe du mécanisme de réparation de l'ADN par ESDSA (extended synthesis-dependent strand annealing)	53
Figure 24 : Mécanisme de réparation de l'ADN par NHEJ décrit chez les procaryotes. 55	55
Figure 25: Courbe de survie après exposition au rayonnement γ de la souche sauvage et des mutants (ΔaddrA, ΔaddrB, ΔaddrC, ΔaddrD, ΔpprA et ΔrecA) de <i>D. radiodurans</i>.....	57
Figure 26: Analyses de la synthèse d'ADN et de la cinétique de réparation des cassures double brin de l'ADN dans la souche sauvage, les simples mutants ΔpprA et ΔrecA et le double mutant ΔrecA ΔpprA après exposition des cellules au rayonnement γ (3,8 kGy) 58	58
Figure 27: Immunolocalisation de la protéine PprA-HA chez <i>D. radiodurans</i> après exposition au rayonnement γ (3.8 kGy)......	59
Figure 28: Morphologie des cellules sauvages et du mutant ΔpprA observée au microscope à épifluorescence avant et après exposition au rayonnement γ (3.8 kGy)	60
Figure 29: Tests de sensibilité aux inhibiteurs de l'ADN gyrase (novobiocine et acide nalidixique)	60
Figure 30: Test d'activité de surenroulement négatif et de décaténation de l'ADN	61
Figure 31: Structure du nucléoïde des espèces radiorésistantes (<i>D. radiodurans</i>, <i>D. grandis</i>, <i>D. murrayi</i>, <i>D. radiopugnans</i>, <i>D. geothermalis</i>, <i>Rubrobacter radiotolerans</i>) et des espèces radiosensibles (<i>E. coli</i> et <i>T. aquaticus</i>).....	67
Figure 32: Séquence logo déterminée à partir des 24 gènes ayant le motif RDRM chez <i>D. radiodurans</i>.....	77
Figure 33: Description des principales voies régulatrices impliquées dans la radiorésistance chez <i>D. radiodurans</i>	78
Figure 34: Principe du mécanisme d'action des systèmes à deux composants.....	81
Figure 35 : Modèle de la régulation de l'activité de la protéine Fnr de <i>E. coli</i> par l'oxygène.....	96
Figure 36 : Modèle de la régulation de l'activité de la protéine Flp de <i>Lactobacillus casei</i> par l'oxygène ou le stress oxydant	97
Figure 37: Représentation de la structure tridimensionnelle de la protéine dimérique CRP^{Ec} de <i>E. coli</i> en complexe avec l'AMPC	99
Figure 38: Représentation de la structure tridimensionnelle de la protéine CRP^{Ec} en absence (A) ou présence (B) d'AMPC	100
Figure 39: Interactions entre la CRP^{Ec} et sa séquence cible consensus.....	101
Figure 40: Représentations schématiques des complexes formés par la CRP^{Ec}, l'ARN polymérase et les promoteurs de classe I (a) et II (b).....	102
Figure 41: Représentations schématiques des promoteurs de classe R1 et R2 dont l'expression est réprimée par la CRP^{Ec}	103
Figure 42: Lien entre le système PTS et l'adénylate cyclase, l'enzyme responsable de la synthèse de l'AMPC	104
Figure 43 : Représentation de la structure tridimensionnelle de la protéine CRP^{Mt} en absence (A) ou présence (B) d'AMPC	109
Figure 44: Les régulateurs transcriptionnels de la sous-famille CRP reconnaissent des séquences d'ADN conservées au sein de différentes espèces bactériennes	110
Figure 45: Régulation de la réponse au choc thermique chez <i>E. coli</i>, <i>B. subtilis</i> et <i>D. radiodurans</i>.....	121
Figure 46: Modèle d'action des ADN topoisomérases de type I sur le relâchement de l'ADN.....	130

Figure 47: Représentation schématique de l'introduction de supertours dans l'ADN, réalisée par les ADN topoisomérases de type IIA.....	131
Figure 48: Modèle des contraintes topologiques générées lors la transcription et la réplication de l'ADN	132
Figure 49: Résumé des différentes fonctions des ADN topoisomérases chez E. coli	134
Figure 50: Structure des protéines SMC chez B. subtilis et MukB chez E. coli	138
Figure 51: Structure en forme de rosette des dimères de SMC visualisée par microscopie à force atomique	139
Figure 52: Modèle de l'organisation du chromosome de E. coli de la souche sauvage et du mutant ΔmukB.....	141
Figure 53: A) Analyse de la localisation de la protéine SMC-GFP chez B. subtilis par microscopie à épifluorescence	142
Figure 54: Structure des protéines SbcC chez B. subtilis et E. coli.....	143
Figure 55: Structure des protéines RecN chez B. subtilis et E. coli	146
Figure 56: Modèle d'action de la protéine RecN dans la réparation des cassures double brin de l'ADN chez D. radiodurans.....	152
Figure 57: Modèle du rôle de RecN dans la stimulation de la recherche d'homologie lors de la recombinaison homologue chez D. radiodurans	153
Figure 58: Mesures de la synthèse d'ADN dans la souche sauvage A) et le mutant ΔrecN B) après exposition des cellules au rayonnement γ (5 kGy)	158
Figure 59: Analyses par western-immunoblot de l'expression de la protéine RecN-FLAG dans une souche sauvage et le mutant ΔddrI après exposition des cellules au rayonnement γ (3,8 kGy)	159
Figure 60: Rôle des protéines RecN et PprA dans la réparation des cassures double brin de l'ADN par recombinaison homologue chez D. radiodurans	163
Tableau 1: Les gènes ddrA, ddrB, ddrC, ddrD et pprA sont les 5 gènes les plus fortement induits après 1 h d'exposition de D. radiodurans au rayonnement γ (3kGy).....	56
Tableau 2: Tableau descriptif de la fonction, du signal détecté et de la séquence d'ADN reconnue par un régulateur transcriptionnel de chaque sous-famille de la famille CRP/FNR.....	95
Tableau 3: Caractéristiques de plusieurs membres de la sous-famille CRP.....	106

Liste des principales abréviations:

ADN: acide désoxyribonucléique

AMPC: adénosine monophosphate cyclique

AP : site abasique

ARN: acide ribonucléique

ADP: adénosine diphosphate

ATP: adénosine triphosphate

BER: base excision repair

CRP: cAMP receptor protein

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

EPS: exopolysaccharides

ESDSA: extended synthesis dependant strand annealing

FITC: fluorescéine

FNR: fumarate and nitrate reductase

GMPc: guanosine monophosphate cyclique

Gy: Gray

h: heure

HTH: helice-tour-helice

J/m^2 : joule par mètre carré

Kb: kilobases

KGy: kilogray

MMR: mismatch repair

Mb: megabase

NER: nucleotide excision repair

NHEJ: non homologous end joining

ORF: open reading frame

PEP: phosphoénolpyruvate

PTS: phosphotransferase system

RDR: radiation dessication response

RDRM: radiation dessication response motif

ROS: reactive oxygen species

SMC: structural maintenance of chromosome

SSA: single strand annealing

UV: ultra violet

RESUME

La bactérie *Deinococcus radiodurans* se distingue par sa résistance exceptionnelle aux rayonnements γ , UV, à la dessiccation et au stress oxydant. La radiorésistance de *D. radiodurans* résulte de l'association de plusieurs mécanismes, dont des systèmes efficaces de réparation de l'ADN et de détoxification des ROS, la protection des protéines contre l'oxydation, une structure compacte du nucléoïde et des protéines spécifiques aux *Deinococcaceae*, qui sont fortement induites après l'exposition des cellules au rayonnement γ .

Le gène *ddrI* (DNA damage response) est fortement induit après exposition des cellules au rayonnement γ et code un régulateur transcriptionnel appartenant à la sous-famille CRP (cAMP receptor protein). Comparée à la souche sauvage, la souche privée de *DdrI* présente des défauts de division cellulaire et/ou de ségrégation de l'ADN, et est sensible aux agents génotoxiques, au stress oxydant et au choc thermique. La prédiction *in silico* des cibles potentielles de *DdrI* suggère que cette protéine régule l'expression d'une centaine de gènes impliqués dans la réplication, la réparation de l'ADN, la transduction de signal, la réponse au stress oxydant et au choc thermique. La séquence consensus 5'TGTGA(N6)TCACA3', extrapolée à partir des 115 séquences cibles potentielles de *DdrI*, est spécifiquement fixée par *DdrI* uniquement en présence d'AMPc. Après un choc thermique, *DdrI* induit directement ou indirectement l'expression de nombreux gènes codant des protéases, des protéines du métabolisme de l'ADN, des lipides, des carbohydrates ainsi qu'un inhibiteur de la traduction.

PprA, une protéine spécifique aux *Deinococcaceae*, joue un rôle crucial dans la radiorésistance et est impliquée dans la ségrégation des chromosomes et/ou la division cellulaire après réparation de l'ADN. De manière intéressante, l'absence de *RecN*, une protéine de la famille SMC, supprime la sensibilité du mutant Δ *pprA* aux agents génotoxiques, aux inhibiteurs de l'ADN gyrase et les défauts de ségrégation observés dans le mutant Δ *pprA* après irradiation des cellules. Après exposition des cellules au rayonnement γ , l'absence de *RecN* réduit la fréquence de recombinaison entre ADN chromosomique et plasmidique, suggérant que *RecN* intervienne dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue. Nous proposons un modèle, dans lequel *RecN*, en favorisant la réparation de l'ADN par recombinaison homologue, nécessite la présence de *PprA* pour favoriser le recrutement des ADN topoisomérases et la résolution des contraintes topologiques engendrées par ce mécanisme de réparation d'ADN.

SUMMARY

The *Deinococcus radiodurans* bacterium exhibits resistance to γ and UV radiation, desiccation and oxidative stress. The molecular mechanisms contributing to the radioresistance of *D. radiodurans* include very efficient DNA repair mechanisms and ROS detoxification systems, protein protection against oxidation, a compact nucleoid structure and a subset of *Deinococcus* specific genes which are strongly induced after γ radiation.

The *ddrI* (D*N*A d*a*mage response) gene is highly up-regulated after exposure to γ radiation and encodes a transcription factor belonging to the CRP (c*A*MP receptorprotein) family. Compared to wild type cells, cells devoid of DdrI display defects in cell division and/or DNA segregation and is sensitive to DNA damaging agents, oxidative stress and heat-shock treatment. In silico predictions of putative DdrI targets suggest that hundreds of genes, belonging to various cellular processes (DNA replication and repair, oxidative stress and heat shock responses, regulation of transcription and signal transduction) may be regulated by DdrI. The pseudopalindromic 5'TGTGA(N₆)TCACA3' consensus sequence, extrapolated from 115 potential DdrI binding sites, is specifically bound by DdrI only in presence of cAMP. After heat shock treatment, DdrI is involved directly or indirectly, in the induction of heat shock response genes coding proteases, proteins involved in DNA, lipid, carbohydrate metabolism and a translation inhibitor.

Among the *Deinococcus* specific proteins required for radioresistance, the PprA protein was shown to play a major role for accurate chromosome segregation and cell division after completion of DNA repair. Here, we analyzed the cellular role of the RecN protein belonging to the SMC family and, surprisingly, observed that the absence of the RecN protein suppressed the sensitivity of cells devoid of the PprA protein to γ - and UV-irradiation and to treatment with mitomycin C or DNA gyrase inhibitors. The absence of RecN also alleviated the DNA segregation defects displayed by the Δ pprA cells recovering from irradiation. After irradiation, the absence of RecN reduced recombination between chromosomal and plasmid DNA, indicating that the RecN protein is important for recombinational repair of DNA lesions. Here, we propose a model in which RecN, by favoring recombinational repair of DNA double strand breaks, requires the PprA protein to facilitate the recruitment of the DNA topoisomerases to resolve the topological constraints generated by DNA double strand break repair through homologous recombination.

INTRODUCTION:

1°) *Deinococcus radiodurans*, l'un des organismes les plus radiorésistants connus à ce jour

A- Présentation de la bactérie *Deinococcus radiodurans*

Initialement nommée *Micrococcus radiodurans*, la bactérie *Deinococcus radiodurans* (du grec *deino* signifiant « étrange, inhabituel » et *coccus* signifiant « grain, baie ») a été découverte par A. Anderson en 1956 comme contaminant de boîtes de conserve de viande « stérilisées » par exposition au rayonnement γ (4 kGy) (Anderson et al., 1956).

Des études phylogénétiques basées sur l'analyse des ARNr 16S ont montré que *Micrococcus radiodurans* appartenait à un groupe phylogénétique unique; par conséquent, une nouvelle famille, les *Deinococcaceae*, a été définie et *M. radiodurans* a été renommée *Deinococcus radiodurans* (Brooks et al., 1981). A ce jour, les *Deinococcaceae* comptent plus de 60 espèces bactériennes (Xi et al., 2018), isolées à partir d'environnements très variés tels que, les sources d'eau chaudes d'Italie et du Portugal [*D. geothermalis*, (Ferreira et al., 1997)], les déserts du Sahara [*Deinococcus deserti*, (de Groot et al., 2005)] ou de Gobi [*Deinococcus gobiensis*, (Yuan et al., 2009)], le tractus intestinal de certains animaux (Kobatake, Tanabe & Hasegawa, 1973), les environnements alpins (Callegan et al., 2008) ou encore dans le continent Antarctique (Hirsch et al., 2004). *D. radiodurans* est à ce jour, l'organisme le plus étudié et caractérisé de cette famille.

L'analyse des ARNr 16S (Weisburg, Giovannoni & Woese, 1989), des ARNr 5S (Bakeeva et al., 1986) et de la conservation de certaines protéines (Gupta & Johari, 1998; Griffiths & Gupta, 2004) montre que la bactérie *D. radiodurans* est phylogénétiquement liée à la bactérie thermophile *Thermus thermophilus*, ce qui a permis de créer un nouveau phylum, le phylum *Deinococcus-Thermus* (**Figure 1**).

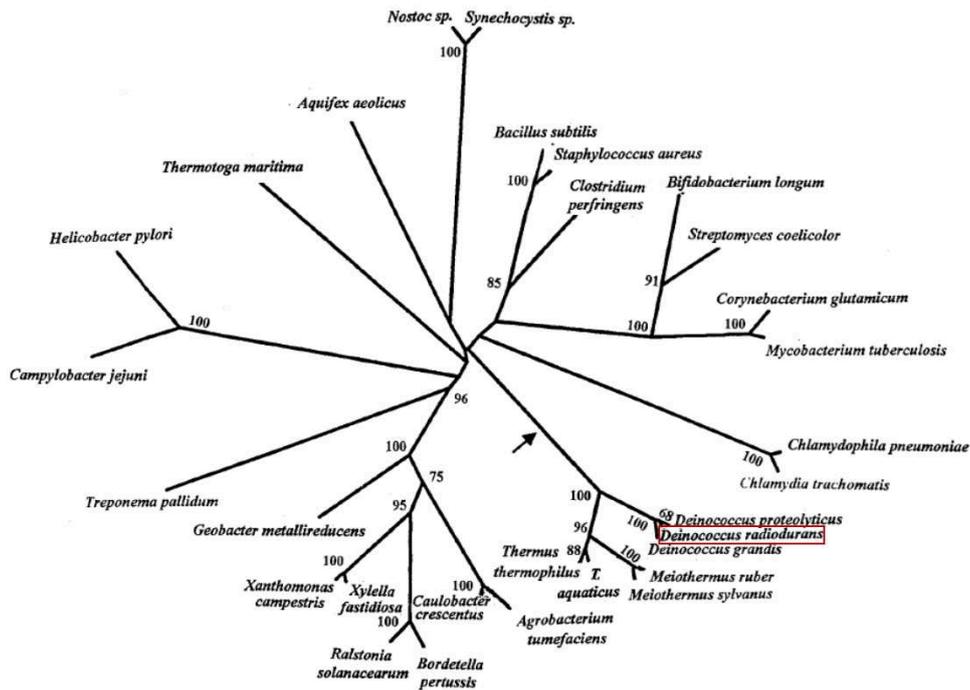


Figure 1 : Arbre phylogénétique établi par comparaison des facteurs sigma σ^{70} (adapté de (Griffiths & Gupta, 2004)).

La bactérie *D. radiodurans* est surtout connue pour sa capacité exceptionnelle à surmonter les effets létaux des agents endommageant l'ADN tels que les rayonnements γ , UV, la dessiccation, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et la mitomycine C (un agent génotoxique qui induit des pontages inter brins entre deux guanines, ce qui entraîne un blocage de la réplication et de la transcription de l'ADN. La mitomycine C est également un agent alkylant et oxydant) (Slade & Radman, 2011).

Les organismes radiorésistants sont retrouvés dans les 3 domaines du vivant, en effet d'autres bactéries en dehors des Deinococcaceae, sont radiorésistantes, comme par exemple *Rubrobacter radiotolerans* (Yoshinaka, 1973), *Methylobacterium radiotolerans* (Green, 1983). Certaines archées telles que *Pyrococcus furiosus* (DiRuggiero et al., 1997), *Thermococcus gammatolerans* (Jolivet et al., 2003) sont également radiorésistantes ou encore certains organismes eucaryotes tels que l'algue verte *Dunaliella bardawill* (Ben-Amotz, 1990), le champignon *Ustilago maydis* (Leaper, Resnick & Holliday, 1980), les tardigrades *Milnesium tardigradum* (Horikawa et al., 2009) ou encore le rotifère *Adineta vage* (Gladyshev & Meselson, 2008). L'existence d'organismes radiorésistants non apparentés suggère que l'acquisition de la radiorésistance soit apparue de manière indépendante dans ces espèces. (Daly, 2012).

B- Organisation de son génome

Le génome de *D. radiodurans* a été initialement séquencé par White et ses collaborateurs (White et al., 1999), cependant il ne s'agissait pas de la souche sauvage R1 ATCC 13989, utilisée par les laboratoires étudiant *D. radiodurans*. Hua et al. (Hua & Hua, 2016) ont donc récemment reséquencé et réannoté son génome. Parallèlement, notre laboratoire a également entrepris de reséquencer le génome de *D. radiodurans* R1 et est en accord avec la réannotation du génome de *D. radiodurans* faite par Hua et al. (Hua & Hua, 2016).

Le génome de *D. radiodurans*, très riche en GC (66.6%), a une taille de 3.28 Mpb. Il est composé de deux chromosomes (2.64 Mpb et 412 Kpb), un mégaplasmide MP1 (177 Kpb), et un plasmide CP1 (45 Kpb). Ces quatre éléments génétiques sont présents à raison de 4 à 10 copies par cellule, selon la phase de croissance et le milieu de culture (Hansen, 1978; Harsojo, Kitayama & Matsuyama, 1981; Passot et al., 2015). Harsojo et son équipe ont montré que la résistance aux rayonnements γ et UV ne dépendait pas du nombre de copies du génome par cellule, suggérant qu'il n'y a pas de corrélation entre le nombre de copies du génome et la radiorésistance. Par ailleurs, *T. thermophilus*, un des organismes les plus proches phylogénétiquement de *D. radiodurans*, est également un organisme polyploïde mais il n'est pas considéré comme un organisme résistant aux rayonnements γ et UV (Ohtani, Tomita & Itaya, 2010). En revanche un minimum de deux copies est nécessaire pour la réparation de l'ADN par recombinaison homologue (Slade & Radman, 2011).

Il a été estimé que 10 à 15 % de son génome a été acquis via le transfert horizontal de gènes (Makarova et al., 2001), dont la plupart est localisé sur le mégaplasmide MP1 (Omelchenko et al., 2005). Parmi les gènes acquis par *D. radiodurans* via le transfert horizontal, nous pouvons citer l'exemple de la topoisomerase IB (dr0690), une enzyme très caractéristique des eucaryotes ou encore le gène dr1372, appartenant à la famille des protéines LEA (late embryogenesis abundant) qui est un gène induit par la dessiccation chez les plantes (Makarova et al., 2001).

C- Morphologie et division cellulaire

D. radiodurans est une bactérie aérobie stricte, non motile, non sporulante et c'est un organisme mésophile, cultivé en laboratoire à 30°C. *D. radiodurans* produit un caroténoïde, la deinoxanthine, qui est responsable de la coloration rose des colonies (Lemee, 1997).

La bactérie *D. radiodurans* a une forme de coque, d'environ 1 µm de diamètre. Les expériences de coloration de Gram indiquent que *D. radiodurans* est une bactérie Gram positif, bien que la structure et la composition de son enveloppe cellulaire s'apparentent davantage à celle des bactéries à Gram négatif. En effet, des expériences de microscopie électronique (**Figure 2**), ont montré que l'enveloppe cellulaire de *D. radiodurans*, d'une épaisseur de 150 nm, est constituée de six couches : 1) la membrane cytoplasmique, 2) un peptidoglycane épais contenant de L-ornithine (Work, 1964), un acide aminé rarement retrouvé dans les parois cellulaires bactériennes, 3) une couche interstitielle, 4) la membrane externe, 5) le S-layer contenant les caroténoïdes, lipides, protéines et polysaccharides et 6) une couche dense composée de carbohydrates (Rothfuss et al., 2006; Makarova, 2001 #15).

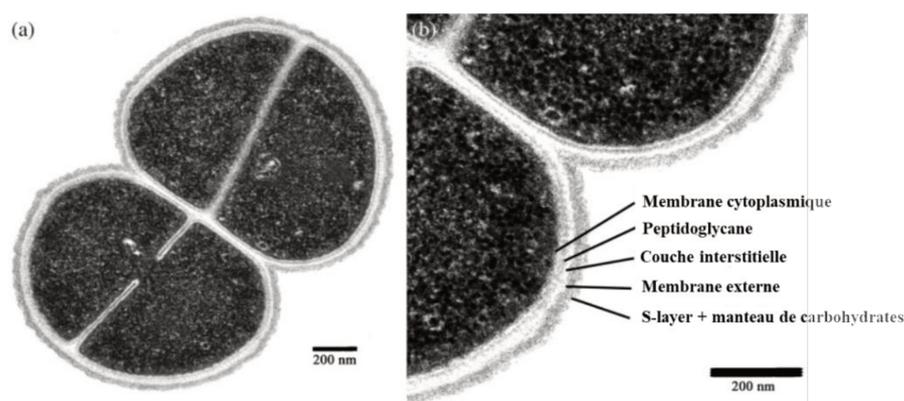


Figure 2 : Structure de l'enveloppe cellulaire de *D. radiodurans* observée par microscopie électronique (adaptée de (Rothfuss et al., 2006)).

D. radiodurans se divise avec un temps de génération de 120 min en conditions standards de culture (milieu liquide TGY 2X: bacto tryptone 1%, extrait de levure 0.6% et glucose 0.2%) à 30°C. Les cellules se divisent successivement dans deux plans perpendiculaires (**Figure 3**). Un premier septum se forme dans un monocoque (1 cellule), donnant lieu à une dyade ou un diplocoque (2 cellules), dans laquelle la ségrégation des deux nucléoïdes est achevée mais les cellules ne sont pas entièrement séparées. Un second septum, perpendiculaire au premier, se forme donnant naissance à une tétrade ou un tétracoque (4 cellules) dans laquelle les quatre nucléoïdes sont séparés mais les cellules restent associées

(Murray, Hall & Thompson, 1983). Lors de la phase exponentielle de croissance, les cellules de *D. radiodurans* sont principalement sous forme de dyades ou de tétrades.

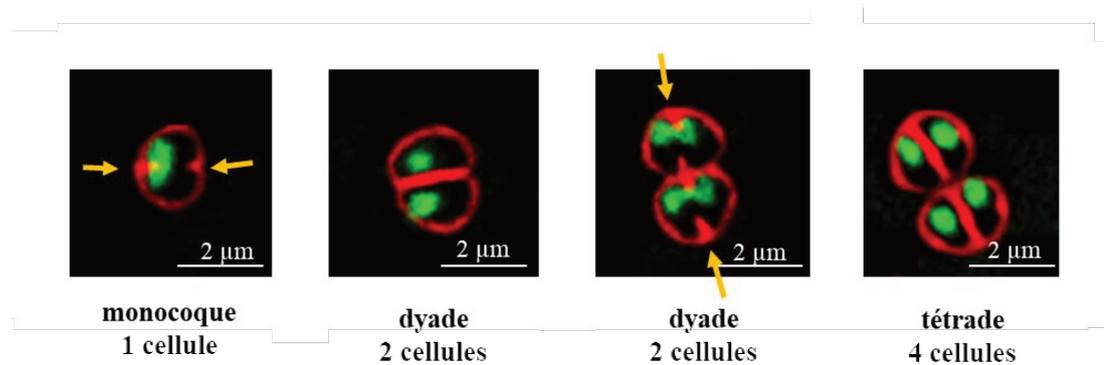


Figure 3 : La division cellulaire chez *D. radiodurans*. Observations des cellules au microscope à épifluorescence. Les membranes sont marquées avec du FM4-64 (rouge) et les nucléoides avec du DAPI (vert). Les plans de division sont indiqués par les flèches jaunes. Barre d'échelle : 2 µm.

La division cellulaire est un processus très coordonné et régulé par un complexe protéique, composé d'un nombre important de protéines, que l'on appelle le divisome (**Figure 4**). Chez les bactéries *E. coli* et *B. subtilis*, la division cellulaire débute par la polymérisation de la protéine FtsZ qui permet la formation de l'anneau Z au centre de la cellule. FtsZ, qui possède une activité GTPase, est ancrée à la membrane cytoplasmique grâce à la protéine FtsA. La formation de l'anneau Z, au centre de la cellule, est finement contrôlée par 2 systèmes, impliqués dans la stimulation ou l'inhibition de la polymérisation de la protéine FtsZ: le système Min et le système NO pour « nucleoid oclusion » (**Figure 5**).

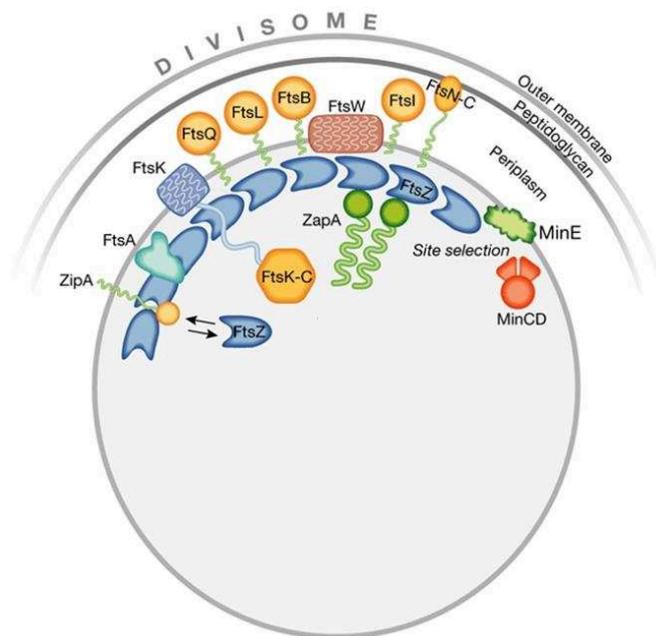


Figure 4 : Représentation schématique des différents constituants du divisome chez *E. coli* (d'après (Vicente & Lowe, 2003)).

Le système Min (**Figure 5**), décrit chez *E. coli*, comprend les protéines MinC, MinD et MinE, et permet d'inhiber la polymérisation de FtsZ, aux pôles de la cellule (Lutkenhaus, 2007; Pinho, Kjos & Veening, 2013). L'ATPase MinD en complexe avec l'ATP, est associée à la membrane et permet le recrutement de MinC, un inhibiteur de la polymérisation de FtsZ. La protéine MinE forme une structure en anneau, qui libère graduellement MinD et MinC de la membrane, en stimulant l'activité ATPase de MinD. La protéine MinD complexée à l'ADP est régénérée dans le cytoplasme, en MinD-ATP, puis s'associe à nouveau à la membrane au pôle opposé et recrute la protéine MinC. Les protéines MinC et MinD oscillent d'un pôle à l'autre de la cellule et la répétition de ce processus, crée un gradient de concentration des protéines MinD et MinC, avec des concentrations importantes aux pôles de la cellule et des concentrations faibles au milieu de la cellule, empêchant ainsi la formation de l'anneau Z aux pôles de la cellule. Chez *B. subtilis*, les protéines MinD et MinC n'oscillent pas d'un pôle à l'autre de la cellule mais sont séquestrées aux pôles de la cellule par les protéines MinJ et DivIVA (Lutkenhaus et al., 2007; Pinho et al., 2013).

Le système NO (**Figure 5**) coordonne la division cellulaire avec la ségrégation des chromosomes. Les protéines NOC (nucleoid oclusion protein) chez *B. subtilis* et SlmA chez *E. coli*, fixent des séquences d'ADN dispersées dans le génome à l'exception de la région terminus. Les protéines NOC et SlmA sont appelées protéines effectrices du nucléoïde et

inhibent l'assemblage de l'anneau Z, tant que la ségrégation des chromosomes n'est pas achevée (Wu et al., 2012).

Après la ségrégation des chromosomes, ces deux systèmes vont donc permettre la polymérisation de FtsZ au centre de la cellule et la formation du septum de division. Cependant l'absence des systèmes Min et NO chez *E. coli* et *B. subtilis*, n'engendre qu'un modeste biais de la polymérisation de FtsZ suggérant que d'autres mécanismes contrôlent la division cellulaire (Bendezu et al., 2009; Moriya et al., 2010; Wu et al., 2012).

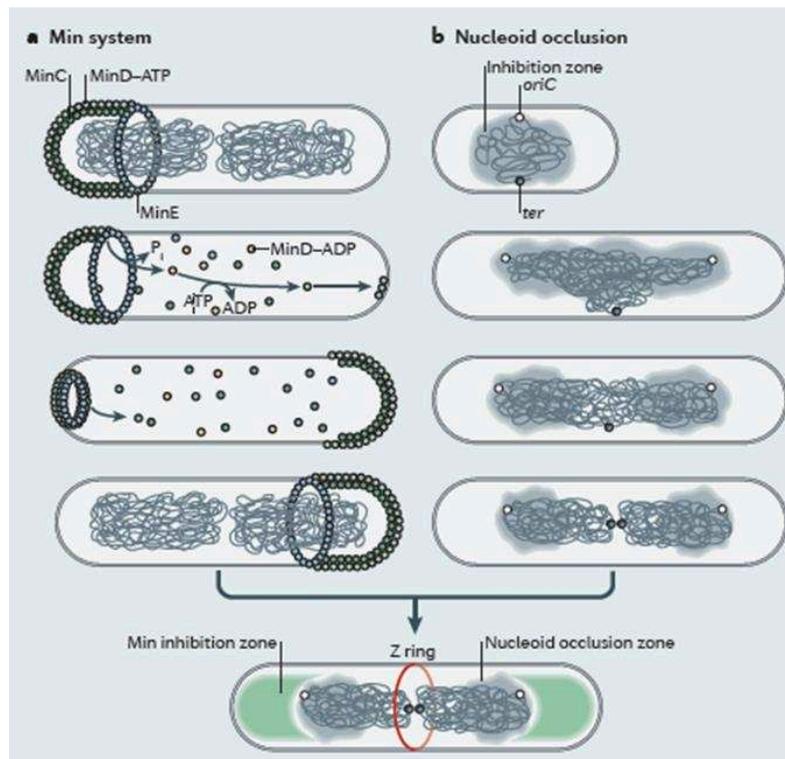


Figure 5 : Les systèmes Min et NO décrits chez *E. coli* et *B. subtilis* (d'après (Pinho et al., 2013)).

La division cellulaire a également été étudiée chez plusieurs bactéries en forme de coque :

- Chez *Neisseria gonorrhoeae*, qui est dépourvue du système NO, il a été démontré que des mutations dans les gènes *minC* et *minD* entraînent une hétérogénéité de la taille des cellules avec la présence de multiples septums. Contrairement à *E. coli*, le mutant Δ *minCD* n'est pas viable suggérant que le système Min joue un rôle plus important chez *N. gonorrhoeae* que chez *E. coli* (Ramirez-Arcos et al., 2001; Szeto et al., 2001).

- Chez la bactérie *Staphylococcus pneumoniae*, qui est dépourvue du système NO et Min, il a été démontré que la protéine DivIVA interagit avec ParB, qui se fixe aux sites *parS* localisés

au niveau de la région oriC et permet la ségrégation des origines de réplication. Il a été proposé que le complexe DivIVA-ParB permette d'ancrer les origines de réplication aux pôles de la cellule (Fadda et al., 2007; Minnen et al., 2011). *S. pneumoniae* possède dans son génome un gène essentiel codant pour la protéine EzrA, un inhibiteur de la polymérisation de FtsZ, ce qui suggère que EzrA a un rôle primordial dans la division cellulaire en inhibant la formation de l'anneau Z au niveau des pôles de la cellule (Steele et al., 2011; Thanassi et al., 2002). Chez *S. aureus*, EzrA n'est pas essentielle mais est requise pour l'homogénéité de la taille des cellules (Jorge et al., 2011).

D. radiodurans possède dans son génome, les gènes codant les homologues des protéines FtsA (dr0630), FtsZ (dr0631), DivIVA (dr1369), MinC (dr1753), MinD (dr0752) et MinE (dr0751). En revanche, aucun homologue des protéines NOC, SlmA et EzrA n'a été identifié dans son génome (Pinho et al., 2013).

La ségrégation des chromosomes est un processus essentiel qui permet à chaque cellule fille d'hériter d'une copie complète du génome. Chez les bactéries, la réplication et la ségrégation se déroulent de manière concomitante. La ségrégation des chromosomes bactériens se déroule en 3 étapes: la ségrégation des origines de réplication, la ségrégation du corps du chromosome puis la ségrégation des régions terminus.

Chez les bactéries *B. subtilis*, *V. cholerae*, *C. crescentus*, la ségrégation des origines de réplication est assurée par le système ParAB (Fogel & Waldor, 2006; Ireton, Gunther & Grossman, 1994; Lin & Grossman, 1998). Des séquences palindromiques (site parS) composées de 16 pb et localisées près de l'origine, sont spécifiquement reconnues et fixées par la protéine ParB, qui possède un domaine HTH (hélice-tour-hélice). Le complexe ParB-parS est reconnu par la protéine ParA, qui possède une activité ATPase. ParB en stimulant l'activité ATPase de ParA, va induire la formation de longs filaments constitués de faisceaux de polymères de ParA qui permettent la ségrégation des complexes ParB-parS aux pôles opposés de la cellule.

L'implication des systèmes ParAB dans la ségrégation des chromosomes a été démontrée chez *C. crescentus*, *V. cholerae* et *B. subtilis*. La délétion de ces systèmes engendre des perturbations de la ségrégation des chromosomes avec une augmentation significative du nombre de cellules anucléées (Badrinarayanan et al., 2012; Possoz, Junier & Espeli, 2012).

Comme décrit précédemment, *D. radiodurans* possède 4 réplicons, les chromosomes I et II ont chacun leur système ParAB (ParA1-ParB1 et ParA2-ParB2 respectivement) et 2 systèmes

ParAB ont été identifiés dans le mégaplasmique MP1 (ParA3-ParB3 et ParA4-ParB4) (White et al., 1999). La délétion de parB1 dans le chromosome I, entraîne un retard de croissance et augmente significativement le nombre de cellules anucléées, comparé à la souche sauvage (Charaka & Misra, 2012). Des expériences de double hybride réalisées chez *E. coli* avec les protéines de *D. radiodurans*, ont montré que FtsA interagit avec FtsZ et MinD, que MinD interagit avec MinC et que la protéine DivIVA interagit avec les protéines ParB1, ParB3, ParB4 alors que MinC interagit avec ParB1 et ParB3. L'interaction des protéines Par avec les protéines du divisome suggère qu'elles ont un rôle important dans la ségrégation du génome chez *D. radiodurans* (Maurya, Modi & Misra, 2016).

D- D. radiodurans est une bactérie naturellement transformable

D. radiodurans est naturellement transformable (Moseley & Setlow, 1968), ce qui facilite les manipulations génétiques. Contrairement à la plupart des espèces bactériennes, dont la compétence est transitoire et finement régulée, comme c'est le cas chez *B. subtilis* (Smits et al., 2005) ou *S. pneumoniae* (Tomasz, 1966), *D. radiodurans* est naturellement transformable tout au long de la phase exponentielle de croissance avec une diminution de la fréquence de transformation en phase stationnaire prolongée (Moseley & Setlow, 1968; Tirgari, 1980).

Pour être naturellement compétentes, les cellules doivent être capables d'internaliser de l'ADN extracellulaire vers la membrane cytoplasmique, via des pili de type IV ou des pseudopili ou encore des systèmes de sécrétion. Puis dans un second temps, des complexes protéiques, situés dans la membrane cytoplasmique, vont permettre la translocation de l'ADN dans le cytoplasme (Kruger & Stingl, 2011).

L'internalisation de l'ADN extracellulaire dans le cytoplasme requiert un mécanisme différent selon le nombre de membranes à franchir.

Chez la bactérie à Gram positif *B. subtilis* (**Figure 6**), les pseudopili, qui traversent la paroi cellulaire, sont composés de pseudopiline (ComGC), issue de la maturation des prépilines par la peptidase ComC et leur assemblage est médié par la protéine membranaire ComGB et l'ATPase ComGA. On retrouve les mêmes pili de type IV chez la bactérie à Gram négatif *N. gonorrhoeae*, qui sont composés de protéines PilE, résultant de la maturation des prépilines par la peptidase PilD, et qui sont assemblés par un complexe protéique composé de la protéine membranaire PilG et l'ATPase PilF. Chez *B. subtilis*, la dissociation/rétraction des pseudopili va permettre à l'ADN exogène de traverser la paroi cellulaire jusqu'à la protéine membranaire ComEA qui dirige ensuite l'ADN vers la protéine ComEC, qui forme un canal à travers la membrane cytoplasmique et permet la translocation de l'ADN à l'aide de l'hélicase ComFA qui « tire » l'ADN simple brin dans le cytoplasme (Kruger & Stingl, 2011).

Chez la bactérie à Gram négatif *N. gonorrhoeae* (**Figure 6**), les pili traversent la membrane externe par un canal formé de la sécrétine PilQ. La dissociation/rétraction des pili impliquant l'ATPase PilT, permet à l'ADN de traverser la membrane externe via la sécrétine PilQ et d'entrer dans le périplasma, où il est pris en charge par la protéine ComE qui dirige l'ADN vers la protéine ComA, qui assure ensuite sa translocation, à l'aide de l'hélicase PriA, à travers la membrane cytoplasmique (Kruger & Stingl, 2011).

Chez *D. radiodurans*, les mécanismes impliqués dans la transformation naturelle sont peu connus, mais les gènes codant pour les homologues des pilines de type IV (dr1232, dr1233, dr1234, dr1235 et dr0442), des protéines Com (comEC (dr1854), (dr0361); comEA (dr1855, dr0207); comF (dr1389); comA (dr0847)) et les homologues des protéines PilD (dr2065), PilQ (dr0774) sont retrouvés dans son génome. Les analyses transcriptomiques (Liu et al., 2003) ont montré que les gènes comEA (dr1855, dr0207) font partie des gènes les plus induits (15 fois) après exposition au rayonnement γ . Néanmoins, le lien possible entre la transformation naturelle et les mécanismes impliqués dans la radiorésistance n'a pas encore été établi à ce jour.

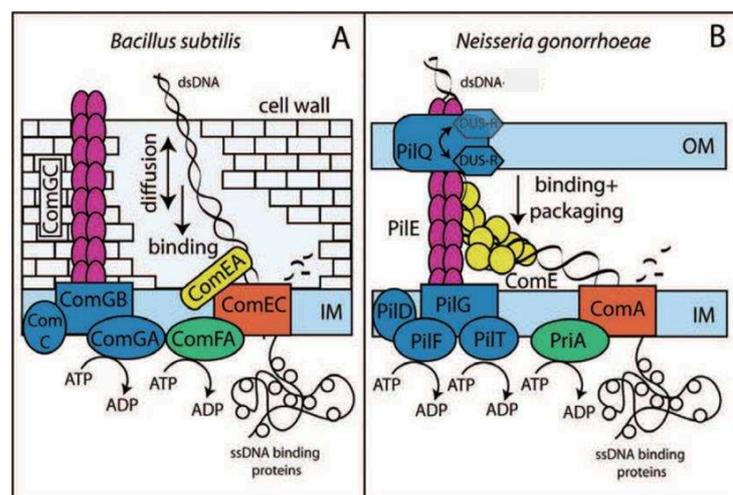


Figure 6 : Modèle d'internalisation de l'ADN extracellulaire chez la bactérie à Gram positif (*Bacillus subtilis*) et à Gram négatif (*Neisseria gonorrhoeae*) (d'après (Kruger & Stingl, 2011)).

La cellule n'internalise qu'un seul brin d'ADN dans le cytoplasme, le deuxième sera dégradé et libéré dans le milieu extracellulaire ou le périplasma dans le cas des bactéries à Gram négatif. L'ADN simple brin entrant, est par la suite pris en charge par des protéines de la famille SSB (single strand DNA binding proteins), afin de prévenir sa dégradation par les nucléases cytosoliques. Chez *S. pneumoniae*, 2 protéines de la famille SSB sont impliquées dans la protection de l'ADN simple brin: SsbB et SsbA (Morrison et al., 2007) et il a été démontré que la protéine DprA joue également un rôle majeur dans la protection de l'ADN simple brin entrant ainsi que dans le recrutement de la recombinaison RecA sur l'ADN simple brin (Morrison et al., 2007).

Quand, l'ADN internalisé présente de l'homologie avec une région du génome hôte, il sera intégré par recombinaison homologue, en revanche si l'ADN internalisé ne présente aucune homologie avec l'ADN de la cellule hôte il sera alors dégradé. Si l'ADN internalisé, est de

l'ADN plasmidique, la reconstitution d'un plasmide circulaire double brin est nécessaire pour son maintien dans la cellule.

Chez *B. subtilis*, il a été démontré que la protéine RecO joue un rôle majeur dans la reconstitution d'un plasmide circulaire double brin, par un mécanisme de type SSA (single strand annealing) d'appariement simple brin des régions complémentaires (Kidane et al., 2004). En revanche, une étude menée au laboratoire chez *D. radiodurans*, a montré que l'absence de RecO, qui possède une activité d'appariement simple brin in vitro, n'entraîne qu'une diminution d'un facteur 6 de la fréquence de transformation par de l'ADN plasmidique, suggérant que la protéine RecO a un rôle mineur dans la transformation par de l'ADN plasmidique (Bouthier de la Tour et al., 2011). Par contre, DdrB, une protéine de type SSB, spécifique des Deinococcaceae, possède également une activité de type SSA in vitro (Xu et al., 2010) et il a été démontré qu'en comparaison avec la souche sauvage, l'absence de DdrB n'entraîne pas de diminution de la fréquence de transformation par de l'ADN génomique mais entraîne une diminution d'un facteur 100 de la fréquence de transformation par de l'ADN plasmidique, suggérant que la protéine DdrB joue un rôle essentiel dans la transformation plasmidique chez *D. radiodurans* (Bouthier de la Tour et al., 2011) (**Figure 7**).

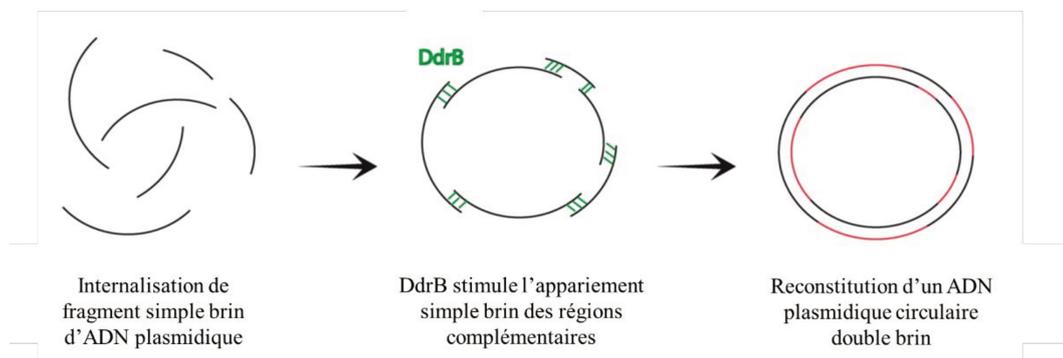


Figure 7 : Modèle proposé chez *D. radiodurans*, pour reconstituer un ADN plasmidique circulaire double brin lors de la transformation par de l'ADN plasmidique.

Il a également été montré au laboratoire, qu'en comparaison avec la souche sauvage, la délétion du gène *dprA* entraîne une diminution d'un facteur 100 et 10 de la fréquence de transformation par l'ADN génomique et par l'ADN plasmidique, suggérant un rôle de la protéine DprA dans la protection de l'ADN entrant (non publiés, thèse de Solenne Ithurbide: Variabilité génétique chez la bactérie radiorésistance *Deinococcus radiodurans*: La recombinaison entre séquences répétées et la transformation naturelle).

E- Une résistance exceptionnelle aux agents génotoxiques

D. radiodurans est un des organismes les plus radiorésistants connus à ce jour. La comparaison des courbes de survie des bactéries E. coli et D. radiodurans après exposition au rayonnement γ (**Figure 8**), indique que D. radiodurans est capable de survivre, sans perte de viabilité, à des doses extrêmement élevées de rayonnement γ , allant jusqu'à 6.8 kGy, alors que la survie est inférieure à 10^{-5} chez E. coli pour une dose inférieure à 1 kGy (Confalonieri & Sommer, 2011). Une dose de 6,5 kGy, va générer environ 300 cassures double brin de l'ADN par équivalent génome (Cox & Battista, 2005).

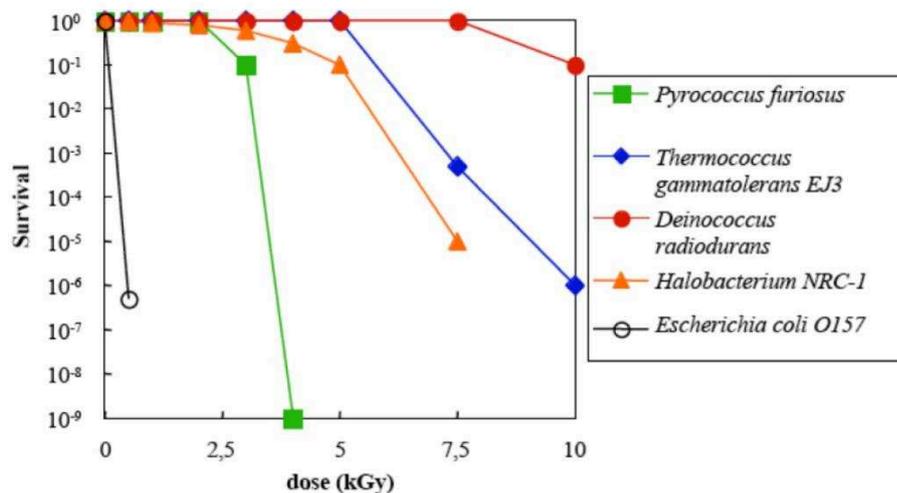


Figure 8 : Comparaison des courbes de survie après exposition au rayonnement γ des bactéries E. coli, D. radiodurans et des archées radiorésistantes *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus gammatolerans* et *Halobacterium* (d'après Confalonieri & Sommer, 2011).

D. radiodurans est capable de surmonter, sans perte de viabilité, des fortes doses de rayonnement UVC, allant jusqu'à 500 J/m^2 , générant jusqu'à 5000 dimères de pyrimidines par équivalent génome (Battista, 1997; Sweet & Moseley, 1976). La dose D37 (dose de radiation nécessaire pour avoir une survie cellulaire de 37%) après exposition au rayonnement UV est de 30 J/m^2 pour E. coli et de 600 J/m^2 pour D. radiodurans (**Figure 9**).

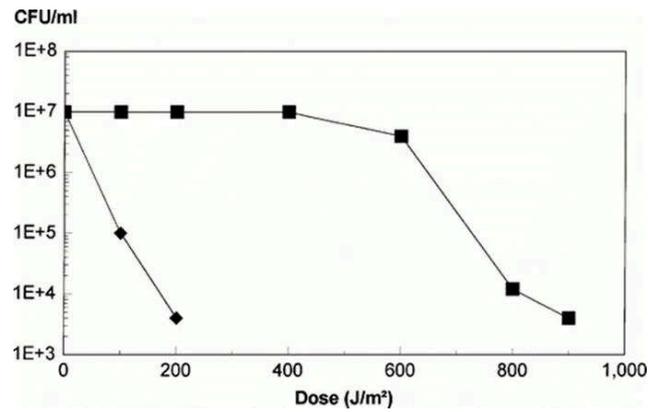


Figure 9 : Comparaison des courbes de survie après exposition au rayonnement UVC des bactéries *D. radiodurans* (carré) et *E. coli* (losange) (d'après Battista, 1997).

Par ailleurs, *D. radiodurans* est connue pour sa capacité exceptionnelle à résister à la dessiccation. Mattimore et Battista (Mattimore & Battista, 1996), ont montré que *D. radiodurans* présente 85% de survie après 6 semaines dans un dessiccateur avec un taux d'humidité inférieur à 5% alors que *E. coli* a une survie inférieure à 10^{-6} après seulement 7 jours de dessiccation (**Figure 10**). La dessiccation entraîne la dénaturation des protéines, la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species), ce qui conduit à la peroxydation des lipides, l'oxydation des protéines et de l'ADN et engendre, après 6 semaines dans un dessiccateur, la formation d'environ 60 cassures double brin de l'ADN par équivalent génome (Dose et al., 1992; Slade & Radman, 2011).

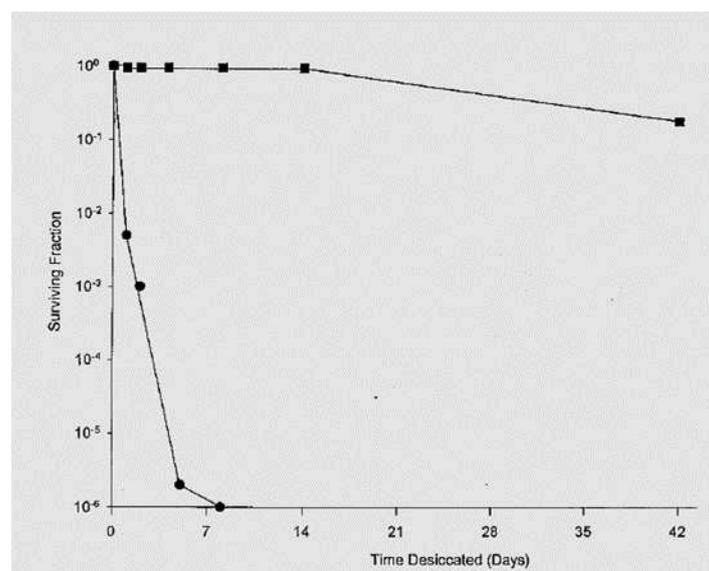


Figure 10 : Courbes de survie des bactéries *D. radiodurans* (carré) et *E. coli* (rond) en fonction du nombre de jours de dessiccation (d'après (Mattimore & Battista, 1996).

Enfin *D. radiodurans* résiste également, sans perte de viabilité, à une exposition de 10 minutes à une concentration de 20 µg/mL de mitomycine C, qui génère 100 à 200 pontages de l'ADN par équivalent génome (Kitayama, 1982). Elle est également capable de faire face à un stress oxydant important. En effet 90% des cellules de *D. radiodurans* sont viables après un traitement de 60 min à une concentration de 10 mM d'H₂O₂ alors que la survie est inférieure à 10⁻⁵ chez *E. coli* pour la même concentration d'H₂O₂ (**Figure 11**) (Wang & Schellhorn, 1995).

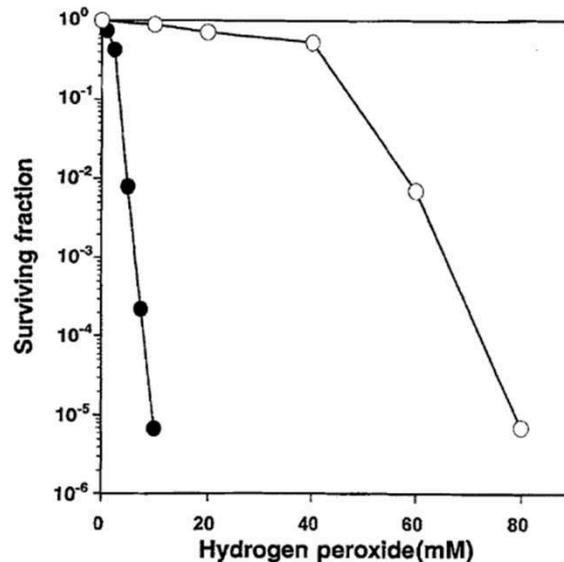


Figure 11 : Comparaison des courbes de survie des bactéries *D. radiodurans* (blanc) et *E. coli* (noir) après traitement des cellules pendant 60 min à des concentrations différentes de peroxyde d'hydrogène (d'après (Wang & Schellhorn, 1995)).

L'origine de la radiorésistance de *D. radiodurans*, a toujours été source de questionnement pour les scientifiques, puisque sa capacité extraordinaire à résister à de telles doses de rayonnement γ , ne peut être expliquée par un processus d'adaptation au cours de l'évolution, étant donné qu'il n'y a pas d'avantage sélectif à être radiorésistant sur Terre sachant que la dose maximale de rayonnement γ reçue sur Terre, mesurée à Guarapari au Brésil, est seulement de 175 mGy par an (Bertin, 1983). Mattimore et Battista (Mattimore & Battista, 1996) ont émis l'hypothèse que l'origine de la radiorésistance de *D. radiodurans* serait due à sa capacité à résister à la dessiccation, qui aurait été acquise suite à une adaptation à l'exposition à des cycles répétés de dessiccation-réhydratation. Par ailleurs, des études transcriptomiques (Tanaka et al., 2004), montrent que parmi les 72 gènes induits après exposition des cellules au rayonnement γ (3 kGy), 33 sont également induits après 2 semaines de dessiccation (avec un taux d'humidité inférieur à 5%), ce qui suggère la mise en place d'une réponse commune pour résister à ces deux stress.

2°) Les mécanismes impliqués dans la radiorésistance

Les rayonnements γ , produits par la désintégration d'éléments radioactifs, sont des photons de très haute énergie, qui au contact des composants cellulaires et en particulier de l'eau contenue dans les cellules, génèrent des ions, qui vont ensuite réagir avec d'autres molécules et produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species). Les trois principaux ROS générés par les rayonnements γ , sont les radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$), les anions superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (**Figure 12**). Le radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) formé par l'ionisation des molécules d'eau, est l'un des ROS les plus réactifs et il peut endommager toutes les macromolécules cellulaires (protéines, acides nucléiques, lipides et carbohydrates) (Von Sonntag, 2006). Les anions superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ne sont pas particulièrement réactifs avec l'ADN mais affectent les protéines ayant des centres Fer-Soufre (2Fe-2S, 4Fe-4S), ce qui provoque la libération des ions Fe^{2+} , qui réagissent avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et induisent la formation de radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) via la réaction de Fenton (Imlay, 2006) (**Figure 12**).

Les ROS vont causer de manière directe ou indirecte, des dommages multiples dans l'ADN (modifications de bases, cassure simple brin et double brin), il a été admis que 80 % des dommages de l'ADN seraient dus à l'action indirecte des ROS et seulement 20 % seraient issus de l'interaction directe des photons γ avec l'ADN (Halliwell, 1999).

Les dommages liés à l'oxydation des protéines sont divers, ils incluent la carbonylation (introduction d'un monoxyde de carbone dans un composé organique) de certains acides aminés (proline, arginine, lysine, et thréonine), l'oxydation des groupes sulfhydryles des méthionines et des cystéines, l'introduction de groupe hydroxyle dans les phénylalanines et les tyrosines, les clivages des liens peptidiques etc (Hepkiss, 2006). L'oxydation des protéines altère leur conformation, leur fonction et leurs interactions, ce qui conduit à la mort cellulaire.

L'oxydation des lipides insaturés, appelée peroxydation des lipides, va provoquer une diminution de la fluidité membranaire et la perte des protéines membranaires (Girotti, 1998; Wong-Ekkabut et al., 2007).

D. radiodurans possède plusieurs mécanismes pour protéger la cellule contre le stress oxydant généré par les rayonnements γ . Ces mécanismes incluent l'élimination des macromolécules oxydées, la détoxification des ROS d'un part par les enzymes antioxydantes

et d'autre part via des systèmes non enzymatiques impliquant les ions manganèses (**Figure 12**), les caroténoïdes et les protéines Dps.

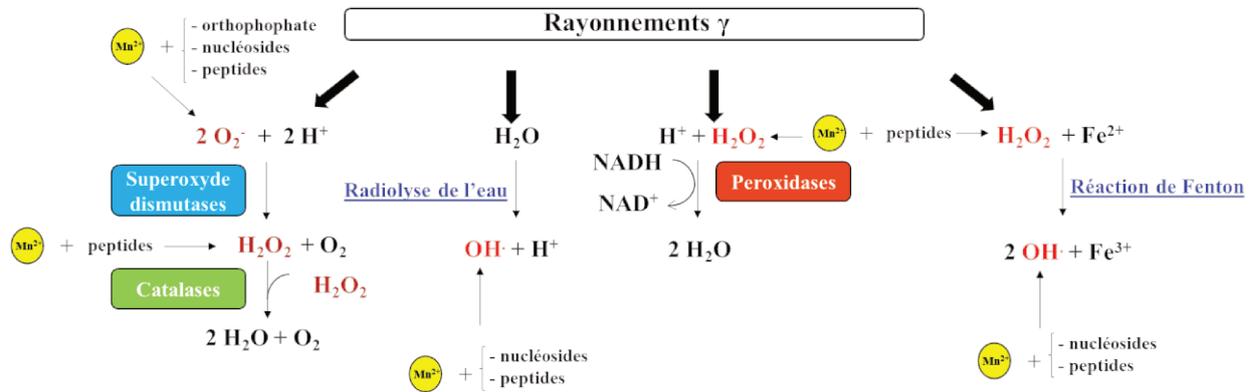


Figure 12 : Les mécanismes mis en place par *D. radiodurans* pour détoxifier la cellule des ROS générés par les rayonnements γ . Les rayonnements γ vont induire la production de ROS ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 et OH^{\cdot}). Les superoxydes dismutases (dr0644, dr1279, dr1546, drA0202) catalysent la dismutation des anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les catalases (dr1998, drA0146 et drA0259) et peroxydases (drA0145, drA0301) catalysent la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en H_2O . Les radicaux hydroxyles (OH^{\cdot}) sont également détoxifiés par les ions manganèse (en jaune) en complexe avec les peptides ou les nucléosides, les anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) peuvent être détoxifiés par les complexes Mn^{2+} - orthophosphate, peptides ou nucléosides et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut être détoxifié par les complexes Mn^{2+} - peptides.

A- Protection contre le stress oxydant

1°) Détoxification des ROS par les catalases, superoxydes dismutases et peroxydases

D. radiodurans possède des systèmes enzymatiques efficaces pour détoxifier la cellule des ROS. Elle dispose de trois catalases (dr1998, drA0146 et drA0259), quatre superoxydes dismutases (dr0644, dr1279, dr1546, et drA0202) et deux peroxydases (drA0145 et drA0301) (White et al., 1999). Les superoxydes dismutases catalysent la dismutation des anions superoxydes (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les catalases et les peroxydases catalysent la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en H_2O (**Figure 12**). Les gènes codant pour ces enzymes antioxydantes sont induits après exposition des cellules au rayonnement γ (Tanaka et al., 2004) et les mutants des catalases et des superoxydes dismutases sont radiosensibles, ce qui suggère que les enzymes antioxydantes jouent un rôle important dans les mécanismes de radiorésistance (Markillie et al., 1999). Comparé à *E. coli*, *D. radiodurans* est nettement plus résistant au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (**Figure 11**). Il a d'ailleurs été montré, chez *D. radiodurans*, que les catalases et les superoxydes dismutases ont des activités bien supérieures à celles de *E. coli* (Tian et al., 2004) (**Figure 13**).

Par ailleurs *D. radiodurans* possède d'autres protéines antioxydantes, telles que les glutaredoxine, thioredoxine, thioredoxine réductase et des alkyl hydroperoxide réductase (White et al., 1999). Chez *E. coli*, l'alkyl hydroperoxide reductase est impliquée dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène (Seaver & Imlay, 2001), les thioredoxines réduisent l'oxydation des cystéines dans les protéines et les thioredoxines reductases sont des enzymes impliqués dans la réduction des thioredoxines (Obiero et al., 2010; Seo & Lee, 2006).

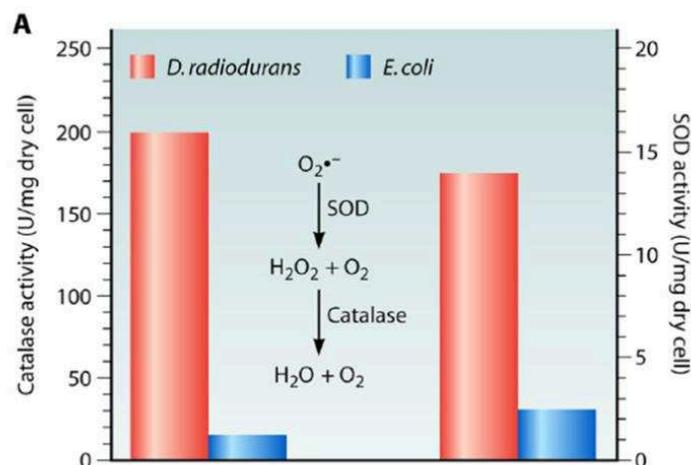


Figure 13 : Comparaison des activités des catalases et des superoxydes dismutases chez *D. radiodurans* et *E. coli* (d'après Slade & Radman, 2011).

2°) Les complexes avec les ions manganèse

Les études de Daly M. et ses collaborateurs (Daly et al., 2007) ont mis en évidence que la radiorésistance était corrélée à la capacité des organismes à protéger les protéines de l'oxydation. Le niveau d'oxydation des protéines peut être évalué par le niveau de carbonylation. Il a été démontré que la quantité de protéines carbonylées augmente après l'exposition des cellules aux rayonnements γ ou UV et elle est inversement corrélée avec la survie cellulaire (Krisiko & Radman, 2010). Il a aussi été démontré que le niveau de carbonylation des protéines extraites de cellules irradiées de *D. radiodurans* est plus bas que celui des protéines extraites des cellules d'espèces radiosensibles (Daly et al., 2007).

En 2010, (Daly et al., 2010) ont mis en évidence chez *D. radiodurans*, le rôle majeur de petites molécules antioxydantes dans la radiorésistance. En effet, ils ont montré que l'ultrafiltrat extrait de *D. radiodurans*, prévenait l'oxydation (carbonylation) des protéines de *E. coli* lors de l'exposition à des doses élevées de rayonnement γ (2, 4 et 8 kGy). Alors que l'ultrafiltrat d'espèces non radiorésistantes (*Pseudomonas putida*, *E. coli*, *Thermus thermophilus*) ne protège pas les protéines de *E. coli* de la carbonylation (**Figure 14**).

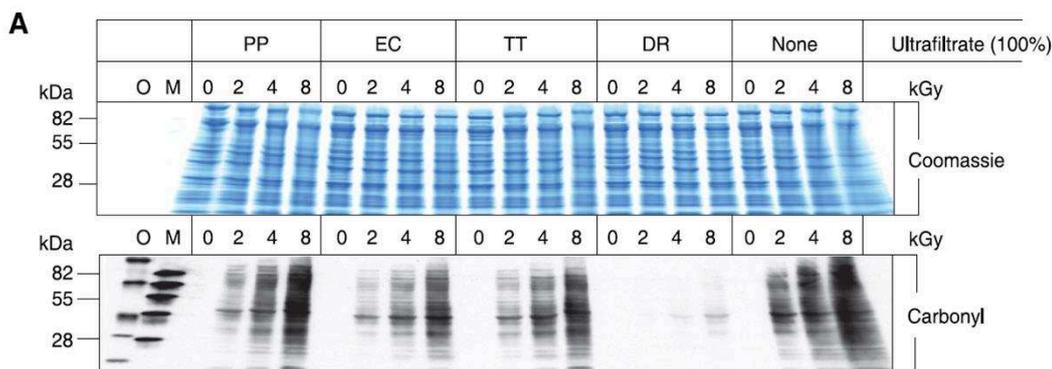


Figure 14 : L'ultrafiltrat (dépourvu de protéines) de *D. radiodurans* protège les protéines de *E. coli* de la carbonylation. L'ultrafiltrat de *Pseudomonas putida* (PP), *E. coli* (EC), *Thermus thermophilus* (TT) ou *D. radiodurans* (DR) est incubé avec des protéines purifiées de *E. coli*, qui sont par la suite, exposées à des doses de 0, 2, 4 ou 8 kGy de rayonnement γ . Les protéines sont séparées par SDS-PAGE et colorées avec du bleu de Coomassie. Le niveau de carbonylation des protéines de *E. coli* est analysé par Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre les groupes carbonyles (d'après Daly et al., 2010).

Comparé aux ultrafiltrats de *P. putida*, *E. coli*, *T. thermophilus*, l'analyse de l'ultrafiltrat de *D. radiodurans* s'est révélé être très riche en ions manganèse, en phosphate inorganique, nucléosides ou bases (uridine, adénosine, uracile), acides aminés et peptides. Par ailleurs, il a été montré que *D. radiodurans* et d'autres espèces radorésistantes accumulent des concentrations intracellulaires de manganèse (Mn^{2+}) exceptionnellement importantes et à l'inverse, une concentration intracellulaire en Fer (Fe^{2+}) faible comparées à *E. coli*, ce qui lui permet de limiter la formation de radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton (**Figure 12**). Comparé à un organisme radiosensible, comme *Shewanella oneidensis* (ratio Mn/Fe = 0.0005), *D. radiodurans* (ratio Mn/Fe = 0.24) accumule 150 fois plus d'ions manganèse et 3.3 fois moins d'ions Fe^{2+} dans la cellule (Daly et al., 2004). De plus, il a été démontré chez *D. radiodurans*, que les cellules perdent leur radorésistance quand elles sont cultivées dans des conditions où l'absorption du manganèse est limitée (Daly et al., 2004). L'ensemble de ces résultats suggère que les ions manganèse ont un rôle crucial dans la radorésistance.

Les études de Daly et ses collaborateurs ont montré que les ions manganèse forment des complexes avec l'orthophosphate, des peptides ou des nucléosides tel que l'uridine, et sont capables de détoxifier la cellule des ROS. Les radicaux hydroxyles sont détoxifiés par les ions manganèse en complexe avec les peptides ou les nucléosides, les anions superoxydes peuvent être détoxifiés par les complexes Mn^{2+} - orthophosphate, peptides ou nucléosides et le peroxyde

d'hydrogène peut être détoxifié par les complexes Mn^{2+} - peptides (**Figure 12**) (Daly et al., 2010; Daly et al., 2007).

Au-delà de son rôle dans la détoxification des ROS, chez *D. radiodurans*, le manganèse remplace également le fer en tant que cofacteur dans de nombreuses enzymes, ce qui permet de limiter la libération des ions Fe^{2+} lors de l'oxydation des protéines, limitant ainsi la production de radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton (**Figure 12**) (Slade & Radman, 2011).

3°) Les caroténoïdes

Les caroténoïdes jouent également un rôle important dans la détoxification des ROS. *D. radiodurans* synthétise un caroténoïde, la deinoxanthine, responsable de la coloration rose des colonies. Il a été montré, in vitro que (Tian et al., 2007; Zhang et al., 2007) les caroténoïdes de *D. radiodurans* sont capables de détoxifier toutes les formes de ROS (l'oxygène singulet 1O_2 (une forme excitée de l'oxygène), H_2O_2 , $OH\cdot$, $O_2\cdot^-$) et par conséquent permet de protéger, les acides nucléiques des dommages liés au stress oxydant, les protéines de la carbonylation (Zhang et al., 2000) et les lipides membranaires de la peroxydation (Stahl et al., 1998). *D. radiodurans* possède 13 gènes impliqués dans la synthèse des caroténoïdes (Makarova et al., 2001) et comparé à la souche sauvage, les mutants affectés dans la voie de biosynthèse de la deinoxanthine, sont plus sensibles au rayonnement γ , à la dessiccation et au stress oxydant généré par l' H_2O_2 (Tian et al., 2007; Zhang et al., 2007). Des études (Tian et al., 2009) ont également montré que la deinoxanthine inhibait l'oxydation des protéines in vitro plus efficacement que d'autres caroténoïdes.

4°) Les protéines Dps

Au-delà de leur rôle dans la compaction de l'ADN chez *E. coli*, les protéines Dps protègent également l'ADN des dommages engendrés par le stress oxydant (Almiron et al., 1992; Martinez & Kolter, 1997). En effet, ces protéines vont fixer l'ADN et chélater les ions Fe^{2+} ce qui limite la production de radicaux hydroxyles ($OH\cdot$) via la réaction de Fenton (**Figure 12**). Par ailleurs, ces protéines sont capables de réduire le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en H_2O (Almiron et al., 1992; Martinez & Kolter, 1997).

Dans le génome de *D. radiodurans*, 2 homologues des gènes codant les protéines Dps ont été identifiés : Dps1 (dr2263) et Dps2 (DrB0092) et les analyses transcriptomiques ont montré que ces gènes étaient induits après exposition des cellules au rayonnement γ (Liu et al., 2003; Tanaka et al., 2004). La délétion des deux gènes dps ($\Delta dps1\Delta dps2$) n'altère pas la

radiorésistance de *D. radiodurans* (Nguyen et al., 2009), mais il a été montré in vitro que la protéine Dps2 protège l'ADN des dommages engendrés par les ROS (Bhattacharyya & Grove, 2007; Reon et al., 2012).

5°) Le métabolisme

Par ailleurs, plusieurs propriétés métaboliques de *D. radiodurans* l'aident également à résister au stress oxydant. Celles-ci incluent 1) la diminution de la production de ROS endogènes via la réduction du nombre d'enzymes de la chaîne respiratoire et l'induction, en réponse au rayonnement γ , du « bypass » glyoxylate du cycle acide tricarboxylique (TCA), qui limite ainsi la libération de NADH et de FADH₂, 2) la protéolyse et l'import des peptides et des acides aminés exogènes, 3) la conversion du glucose en précurseur des dNTPs et 4) la production de granules de stockage de carbohydrates et de polyphosphates qui pourraient fournir l'orthophosphate agissant en synergie avec le Mn²⁺ pour piéger les ROS (Slade & Radman, 2011). Il a par ailleurs été observé qu'après exposition des cellules au rayonnement γ , de nombreux gènes du métabolisme sont dérégulés. En particulier, les gènes impliqués dans le cycle TCA sont réprimés (Luan et al., 2014; Tanaka et al., 2004; Zhang et al., 2005).

6°) Elimination des macromolécules oxydées

Le stress oxydant va provoquer des dommages de l'ADN (oxydation des nucléotides, cassures simple et double brin). Afin de prévenir l'incorporation des nucléotides oxydés dans l'ADN, (ce qui conduirait après répllication de l'ADN, à l'introduction de mutations dans le génome), *D. radiodurans* va les dégrader et les exporter de la cellule via l'action des protéines de la famille Nudix hydrolases (Bessman, Frick & O'Handley, 1996; Xu et al., 2001). Parmi les protéines de la famille Nudix hydrolases, MutT hydrolyse le 8-oxo-dGTP, un des désoxyribonucléotides oxydés le plus étudié et préserve *D. radiodurans* de son incorporation dans l'ADN, qui introduirait une mutation par transversion lors de la répllication de l'ADN (A:T en C:G ou G:C en T:A). En comparaison avec *E. coli*, qui possède 11 hydrolases (Blattner et al., 1997), 23 gènes codant des hydrolases de la famille Nudix ont été identifiés dans le génome de *D. radiodurans* (White et al., 1999), dont 5 sont induits après exposition des cellules au rayonnement γ (Liu et al., 2003).

Les protéines oxydées vont, quant à elles, devenir non fonctionnelles et leur conformation va être altérée, ce qui provoque la formation d'agrégats de protéines, qui est toxique pour la cellule. Ces protéines oxydées vont donc devoir être rapidement dégradées par

des protéases. *D. radiodurans* possède un nombre élevé de protéases putatives (Makarova et al., 2001), dont la plupart des gènes codant pour ces protéases, sont induits après exposition au rayonnement γ (Tanaka et al., 2004). Il a été montré que les rayonnements γ engendraient une dégradation importante des protéines (Joshi et al., 2004). Chez les bactéries, la protéolyse cellulaire est assurée par les protéases ATP-dépendantes appartenant aux familles Lon (Lon1: dr1974 et Lon2: dr0349) et Clp qui comprennent un domaine protéolytique (ClpP: dr1972) et un domaine ATPasique (ClpA: dr0588, ClpB: dr1046, ClpC: dr1117 et ClpX: dr1973). L'absence des protéases Lon1 ou Lon2 n'a pas d'effet sur la radiorésistance mais réduit la résistance à la puromycine, un antibiotique, qui induit la libération prématurée de la chaîne polypeptidique du ribosome, ce qui entraîne la formation de protéines tronquées ou mal repliées (Servant et al., 2007). Ces résultats suggèrent que les protéases Lon1 et Lon2 jouent un rôle important dans l'élimination des protéines tronquées. Les cellules dépourvues des protéines ClpX ou ClpP deviennent radiosensibles et en comparaison avec la souche sauvage, la cinétique de réparation de l'ADN, après exposition des cellules au rayonnement γ est ralentie dans le double mutant $\Delta clpX \Delta clpP$. Par ailleurs, un retard important de la reprise de la division cellulaire après la reconstitution de son génome a également été constaté chez le double mutant $\Delta clpX \Delta clpP$ et les observations de la morphologie des cellules par microscopie à épifluorescence, montrent qu'après exposition au rayonnement γ , les cellules $\Delta clpX \Delta clpP$ présentent des anomalies importantes à savoir, une décondensation du nucléoïde, une augmentation de la proportion de cellules anucléées et la formation anormale des septums de division (Servant et al., 2007). L'ensemble de ces données suggère que ClpPX est impliquée dans le contrôle de la ségrégation et la division cellulaire après exposition des cellules à un stress génotoxique.

Par ailleurs les analyses transcriptomiques (Tanaka et al., 2004) ont montré que plusieurs gènes codant pour des protéines chaperonnes sont également induits après exposition des cellules au rayonnement γ , suggérant qu'elles puissent jouer un rôle dans le repliement des protéines endommagées par exposition au rayonnement γ .

B- Réparation efficace des lésions de l'ADN

La radiorésistance de *D. radiodurans* n'est pas due à un mécanisme de protection de l'ADN, qui empêcherait la formation des lésions de l'ADN, puisque pour les mêmes doses de rayonnement γ , le nombre de cassures double brin de l'ADN est identique chez *E. coli* et *D. radiodurans* (Gerard et al., 2001). En revanche, *D. radiodurans* est capable de reconstituer en quelques heures, son génome à partir de centaines de fragments d'ADN (**Figure 15**), alors que la plupart des micro-organismes, dont *E. coli*, sont incapables de tolérer plus de 2 ou 3 cassures double brin de l'ADN.

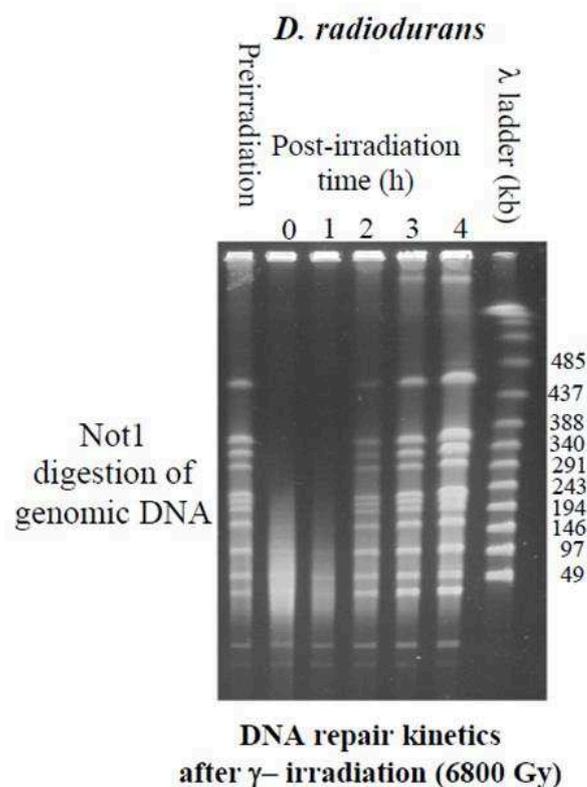


Figure 15 : Cinétique de reconstitution du génome de *D. radiodurans* après exposition des cellules au rayonnement γ (6.8 kGy), visualisée par le suivi du profil de digestion de l'ADN par NotI par électrophorèse en champ pulsé. Les cellules sont exposées à une dose de 6.8 kGy de rayonnement γ . Des échantillons de culture sont prélevés à différents temps (0, 1, 2, 3 et 4 heures) d'incubation après irradiation. L'ADN contenu dans des cubes d'agarose est alors digéré par NotI et soumis à une électrophorèse en champ pulsé. Le premier puits correspond à de l'ADN provenant de cellules non irradiées. Immédiatement après irradiation, le génome est fragmenté et au bout de 2 heures, une reconstitution totale du profil de digestion par NotI peut être observée, suivie d'une augmentation de la quantité d'ADN reflétant la reprise de la réplication (d'après (Confalonieri & Sommer, 2011)).

Les rayonnements γ engendrent des dommages multiples de l'ADN (modification des bases et des nucléotides, des cassures simple brin et double brin). Pour réparer les nucléotides ou les bases endommagées par les agents génotoxiques, *D. radiodurans* possède des ADN glycosylases qui interviennent dans le mécanisme de réparation par excision de base (BER), une voie de réparation par excision de nucléotides (NER) dépendante de UvrABC et une voie alternative dépendante de UVSE. Les cassures double brin de l'ADN, considérées comme les plus délétères et les plus difficiles à réparer, peuvent être réparées chez *D. radiodurans* par recombinaison homologue, par un mécanisme d'appariement simple brin des régions complémentaires : SSA (single strand annealing) et un mécanisme d'appariement simple brin dépendant d'une synthèse massive d'ADN: l'ESDSA (extended synthesis deependent strand annealing) (Slade & Radman, 2011).

1°) **Réparation par excision de base : BER**

Les rayonnements ionisants ainsi que les agents alkylants induisent des modifications des bases de l'ADN, qui peuvent induire l'apparition de mutations dans le génome. Ces bases modifiées doivent donc être rapidement éliminées du génome par un mécanisme de réparation par excision de base qui protège la cellule des effets délétères de ces traitements. Pour cela *D. radiodurans* possède 12 ADN glycosylases, qui reconnaissent spécifiquement un type de base modifiée. Par exemple, les bases alkylées sont reconnues par des AlkA glycosylases, l'uracile, généré par déamination de la cytosine, est reconnu par une uracil-ADN glycosylase.

Les ADN glycosylases vont éliminer la base endommagée (**Figure 16**) par hydrolyse de la liaison N-glycosidique entre la base et le désoxyribose et générer un site abasique (AP). Ce site abasique est ensuite reconnu par une endonucléase spécifique, l'AP endonucléase, qui clive le squelette sucre-phosphate et une phosphodiesterase élimine le désoxyribose, laissant une brèche dans la molécule d'ADN qui sera comblée par l'ADN polymérase I et/ou III et une l'ADN ligase A (Slade & Radman, 2011).

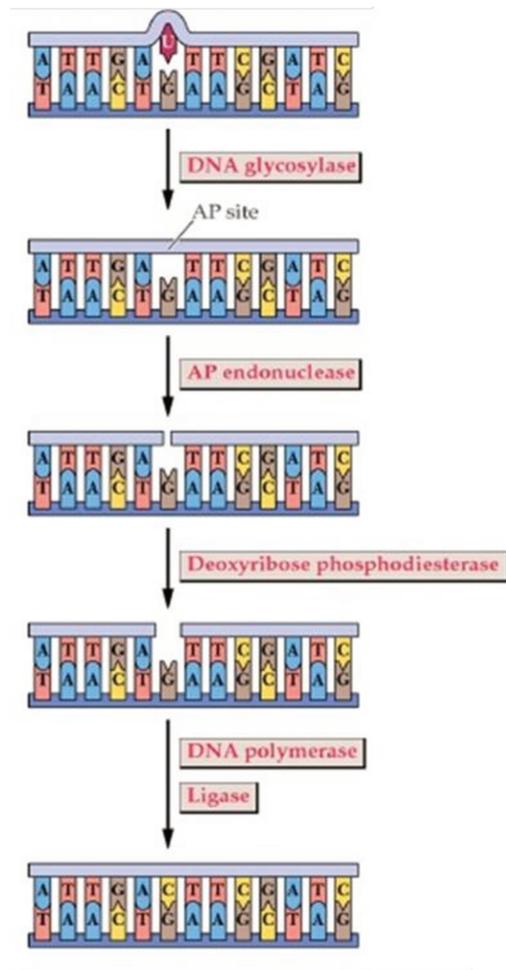


Figure 16 : Mécanisme de réparation par excision de base (BER) (image issue du site <https://image.slidesharecdn.com/dna-repair-by-ssolili-1212069443880000-9/95/dna-repair-22-728.jpg?cb=1212044371>).

2°) Réparation par excision de nucléotides: NER

D. radiodurans possède deux voies de réparation par excision de nucléotides : la voie d'excision classique, UvrABC (semblable à celle de *E. coli*) et une voie alternative d'excision UVDE (UV damage endonuclease), semblable à celle employée par *Schizosaccharomyces pombe* (Minton, 1994; Moseley & Evans, 1983). Ces mécanismes sont impliqués dans l'excision des dimères de thymine, provoqués par l'exposition au rayonnement UV, qui engendrent des torsions et déformations de la double hélice d'ADN ainsi que des cassures double brin de l'ADN.

- Dans la voie UvrABC décrite chez *E. coli* (**Figure 17**), deux molécules UvrA (protéine de fixation à l'ADN ayant une activité ATPase) et une molécule UvrB, forment un complexe qui reconnaît les déformations de la double hélice de l'ADN. La double hélice de l'ADN va être localement dénaturée et « pliée » de 130 degrés grâce à l'activité hélicase d'UvrB. Après la

dissociation du dimère UvrA, l'endonucléase UvrC est recrutée et clive le brin endommagé à deux sites différents : un premier à 7 nucléotides en 5' de la lésion et un deuxième à 3 ou 4 nucléotides en 3' de la lésion. UvrB et UvrC sont ensuite dissociées et l'hélicase UvrD, agissant de manière concertée avec l'ADN polymérase I, libère l'oligonucléotide de 12-13 nucléotides puis l'ADN polymérase I comble la brèche en utilisant le brin complémentaire comme matrice et une ADN ligase catalyse la formation d'une liaison phosphoester entre les extrémités d'ADN (Hoeijmakers, 1991; Kisker, Kuper & Van Houten, 2013).

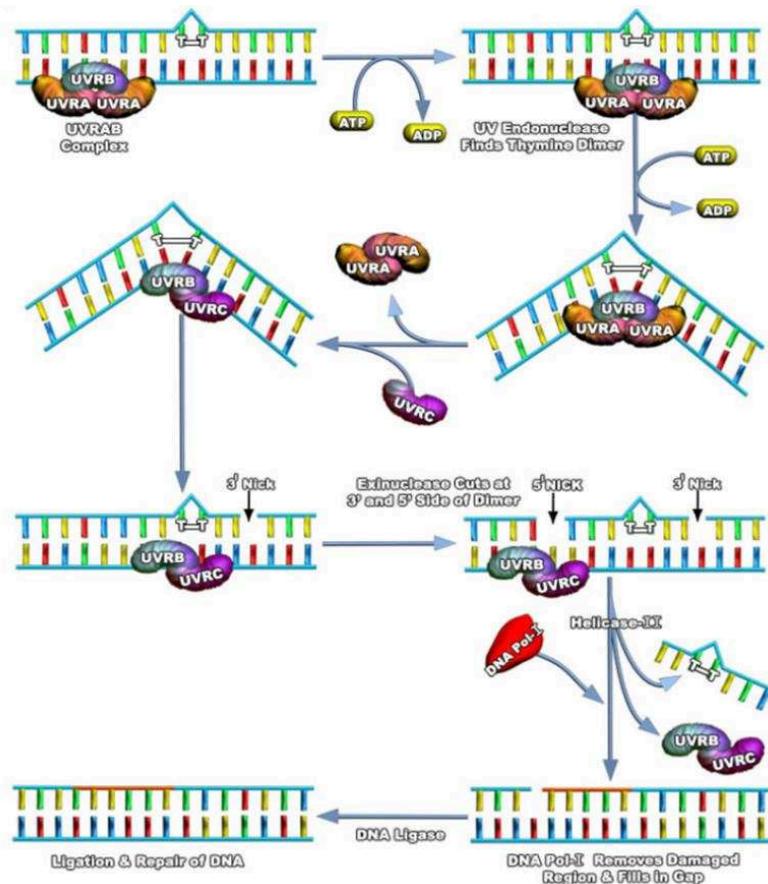


Figure 17: Mécanisme de réparation des dimères de thymine par excision de nucléotides chez *E. coli* : voie UvrABC (image issue de <https://www.qiagen.com/us/shop/genes-and-pathways/pathway-details/?pwid=391>).

- Dans la voie UVDE, décrit chez *S. pombe* (Figure 18), l'endonucléase β UvsE reconnaît les déformations de la double hélice de l'ADN, se fixe au site de la lésion et clive en 5' de la lésion (McCready, Osman & Yasui, 2000). L'ADN polymérase I comble la brèche, l'extrémité 5' débordante est clivée par une endonucléase et une ADN ligase catalyse la formation de la liaison phosphoester entre les extrémités d'ADN (Alleva et al., 2000).

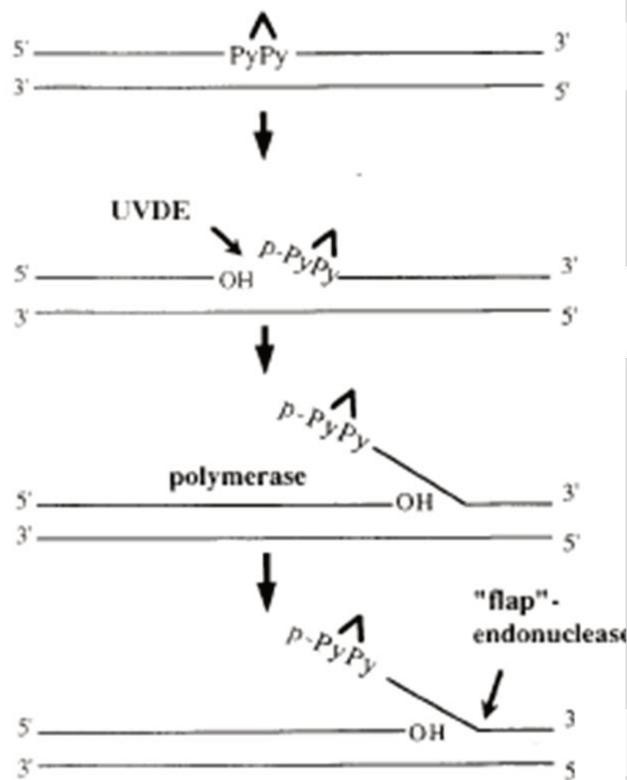


Figure 18: Mécanisme de réparation des dimères de thymine par excision de nucléotides chez *S. pombe*: voie UVDE (Yonemasu et al., 1997).

D. radiodurans possède les homologues des protéines UvrA (dr1771 et drA0188), UvrB (dr2275), UvrC (dr1354), UvrD (dr1775, dr1572) et de la protéine UvsE (dr1819) qui est une endonucléase dépendante du manganèse Mn^{2+} (Earl et al., 2002b).

Les études de Tanaka et al. (Tanaka et al., 2005), ont montré que chez *D. radiodurans*, les simples mutants $\Delta uvrA1$ et $\Delta uvrA2$ présentent, respectivement, une légère et aucune diminution de la survie cellulaire au rayonnement UV comparé à la souche sauvage, et dans le cas du simple mutant $\Delta uvsE$, une diminution de la survie cellulaire n'est observée qu'à des doses très élevées de rayonnement UV ($1500 J/m^2$). Par contre, l'absence des 2 gènes *uvrA1* et *uvsE* sensibilise fortement *D. radiodurans* au rayonnement UV, suggérant que les deux voies de réparation par excision de nucléotides exercent des fonctions redondantes et peuvent se substituer l'une et l'autre (Earl et al., 2002b). Par ailleurs, la délétion d'*uvrA2* (drA0188) dans les simples mutants $\Delta uvrA1$, $\Delta uvsE$ ou dans le double mutant $\Delta uvrA1 \Delta uvsE$ n'augmente pas la sensibilité au rayonnement UV, suggérant que la protéine UvrA2 ne joue pas un rôle majeur dans la réparation des lésions par excision de nucléotide (Tanaka et al., 2005).

Cependant, il a été constaté que chez le double mutant $\Delta uvrA1 \Delta uvsE$, l'élimination des dimères de pyrimidines du génome n'était pas complètement abolie. De plus, le simple mutant $\Delta recA$ a une sensibilité au rayonnement UV plus importante que le double mutant $\Delta uvrA1 \Delta uvsE$ (Tanaka et al., 2005), ce qui suggère que chez *D. radiodurans*, la recombinaison homologue joue également un rôle important dans la réparation de l'ADN après exposition des cellules au rayonnement UV.

3°) Le système de réparation des mésappariements

Le système de réparation des mésappariements (ou MMR pour mismatch repair) est un mécanisme de reconnaissance et de réparation des mésappariements de l'ADN, qui permet d'augmenter la fidélité de la réplication et de la recombinaison homologue. Chez *E. coli*, la protéine MutS reconnaît et fixe le mésappariement, puis la protéine MutL est recrutée et active l'endonucléase MutH qui clive le brin néosynthétisé au niveau d'un site GATC en 5' ou 3' du mésappariement (**Figure 19**). Chez *E. coli*, le brin néosynthétisé est différenciable du brin parental du fait qu'il n'est pas encore méthylé. L'hélicase UvrD catalyse la séparation des 2 brins d'ADN, le brin matrice est protégé de la dégradation par les protéines SSB et le brin néosynthétisé, portant le mésappariement, est dégradé par une exonucléase. L'ADN polymérase III et une ADN ligase vont ensuite combler la brèche d'ADN et catalyser la formation de la liaison phosphoester entre les extrémités d'ADN (Joseph, Duppatla & Rao, 2006).

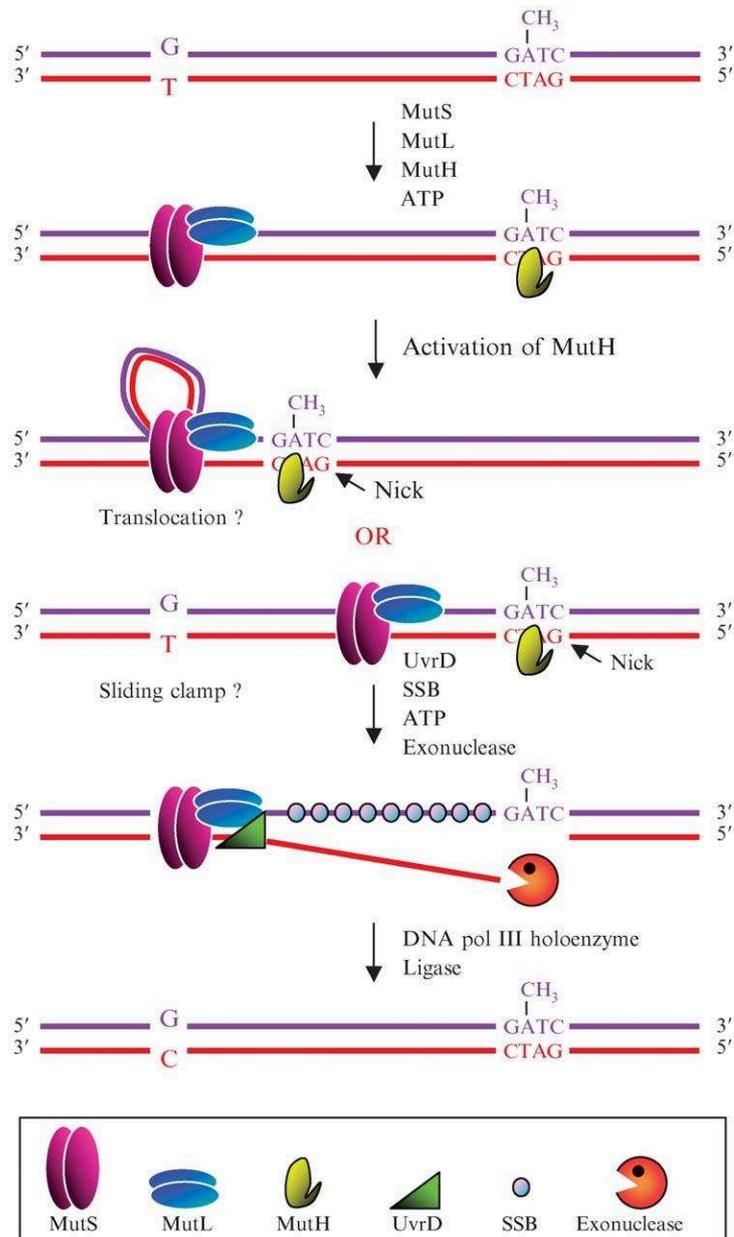


Figure 19: Système de réparation des mésappariements décrit chez *E. coli* (D'après Joseph et al, 2006).

D. radiodurans possède un système de réparation des mésappariements fonctionnel, composé de 2 homologues du gène *mutS*: *mutS1* et *mutS2* (dr1039 et dr1976), 1 homologue de *mutL* (dr1696) et 1 homologue d'*uvrD* (dr1775) (Mennecier et al., 2004). En revanche, aucun homologue de *mutH* n'a été identifié dans son génome.

La délétion de *mutS1* ou *mutL* chez *D. radiodurans* augmente d'un facteur 7 la fréquence spontanée d'apparition de mutants [rifampicine^R] (l'apparition de mutation spontanée à des positions spécifiques dans le gène *rpoB*, altère la sous-unité β de l'ARN polymérase, ce qui la

rend résistante à la rifampicine) et augmente d'un facteur 10 la fréquence de recombinaison entre des ADN qui ne diffèrent que par une base (Mennecier et al., 2004), suggérant que les protéines MutS1 et MutL sont requises pour inhiber la recombinaison illégitime et participent donc au maintien de l'intégrité du génome chez *D. radiodurans*. En revanche, l'inactivation de *mutS2* n'a pas d'effet sur la fréquence de mutagenèse spontanée et de recombinaison (Mennecier et al., 2004). L'absence de MutS1 ou MutL n'engendre pas d'augmentation de la sensibilité aux rayonnements γ , UV et au traitement à la mitomycine C, suggérant que le système de réparation des mésappariements n'est pas essentiel à la reconstitution d'un génome fonctionnel chez *D. radiodurans* (Mennecier et al., 2004).

4°) La recombinaison homologue

La recombinaison homologue est le mécanisme principal de réparation des cassures double brin de l'ADN chez les bactéries (Wyman & Kanaar, 2006). Ce mécanisme de réparation, très fidèle, implique un échange de brin entre la molécule d'ADN endommagée et un ADN homologue intact. L'existence de la recombinaison homologue a été mise en évidence pour la première fois chez *D. radiodurans* par Daly et Minton (Minton & Daly, 1995). Le mécanisme de recombinaison homologue se déroule en 4 étapes :

1) La recombinaison homologue débute par la reconnaissance des cassures double brin suivie de la maturation des extrémités de l'ADN afin de générer des extrémités 3' simple brin débordantes sur lesquelles la recombinase RecA se fixe pour former un nucléofilament. Chez *E. coli*, ce processus est réalisé par deux complexes protéiques : la voie majoritaire RecBCD (Dillingham & Kowalczykowski, 2008) et la voie alternative RecFOR (Horii & Clark, 1973; Sakai & Cox, 2009). *D. radiodurans* ne possède pas d'homologue de la voie RecBCD (à l'exception de RecD). En revanche, elle possède les homologues des protéines impliquées dans la voie RecFOR : RecQ, RecJ, RecF, RecO et RecR et il a été démontré chez *D. radiodurans*, que les simples mutants Δ recF, Δ recO ou Δ recR sont autant radiosensibles que le simple mutant Δ recA (Bentchikou et al., 2010).

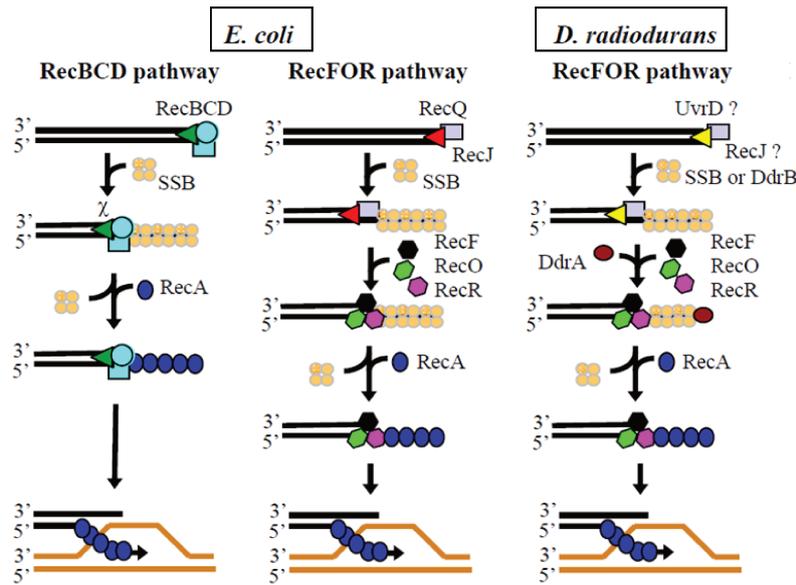


Figure 20: Voies enzymatiques impliquées dans la maturation des extrémités d'ADN (d'après (Confalonieri, 2011)).

Dans la voie RecFOR chez *E. coli*, il a été démontré que l'hélicase RecQ 3'->5' permet l'ouverture de la double hélice de l'ADN et que l'exonucléase RecJ 5'->3' est impliquée dans la dégradation de l'extrémité 5' de l'ADN (**Figure 20**) (Kowalczykowski, 2000).

D. radiodurans possède 3 hélicases (UvrD, RecQ et RecD). Les cellules dépourvues de la protéine RecQ ont une radiorésistance comparable à celle de la souche sauvage. En revanche, l'absence de l'hélicase UvrD engendre une sensibilisation de *D. radiodurans* au rayonnement γ et un retard important de la cinétique de réparation de l'ADN. Les doubles mutants $\Delta uvrD\Delta recQ$ et $\Delta uvrD\Delta recD$ présentent la même radiosensibilité que le simple mutant $\Delta uvrD$, suggérant que l'hélicase UvrD joue un rôle majeur dans la maturation des extrémités de l'ADN (Bentchikou et al., 2010). RecJ est la seule protéine chez *D. radiodurans* à posséder une activité exonucléase 5'->3'. Bentchikou et al. (Bentchikou et al., 2010) ont également montré que RecJ était une protéine essentielle à la viabilité cellulaire, ce qui suggère qu'elle joue un rôle clé dans la maintenance du génome (**Figure 20**).

Chez *D. radiodurans*, l'ADN simple brin formé par la maturation des extrémités de l'ADN, est ensuite recouvert par les protéines SSB et/ou DdrB, une protéine spécifique des Deinococcaceae, afin de prévenir sa dégradation (Norais et al., 2009). La protéine DdrA, également spécifique des Deinococcaceae, se fixe aux extrémités 3' et les protège de la dégradation (Harris et al., 2004).

Chez *E. coli*, les protéines RecF, RecO et RecR (**Figure 20**) vont ensuite reconnaître les jonctions entre l'ADN simple et double brin et induire la dissociation des protéines SSB (et/ou DdrB dans le cas de *D. radiodurans*) des extrémités 3' débordantes pour permettre le chargement de la protéine RecA sur l'ADN simple brin (Morimatsu & Kowalczykowski, 2003).

2) L'étape suivante de la recombinaison homologue est la recherche d'homologie (**Figure 21**). Pour cela, les extensions 3' simple brin, chargées de la protéine RecA, envahissent l'ADN double brin homologue entraînant la formation d'un ADN hétéroduplex et de deux D-loops (structure composée de 3 brins d'ADN).

3) Chez *E. coli*, les structures D-loops sont reconnues par l'hélicase PriA (**Figure 21**) qui va permettre le chargement du réplisome sur les fourches de réplication et l'initiation de la synthèse d'ADN par extension des extrémités 3' de l'ADN hétéroduplex, ce qui génère la formation des jonctions de Holliday (structure composée de 4 brins d'ADN). Chez *D. radiodurans*, la protéine PriA est dépourvue d'activité ATPase et d'ouverture de l'ADN, la qualifiant de pseudohélicase (Lopper, Boone & Morrow, 2015). En revanche, PriA est capable de fixer l'ADN et il a été démontré qu'elle interagissait physiquement avec l'hélicase DnaB, suggérant que chez *D. radiodurans*, PriA joue également un rôle dans le chargement du réplisome sur les fourches de réplication, via son interaction avec DnaB (Lopper et al., 2015).

4) Chez *E. coli*, l'extension de l'ADN hétéroduplex, via la migration des jonctions de Holliday, est catalysée par le complexe RuvABC (**Figure 21**) qui est impliqué dans la migration, puis la résolution des jonctions de Holliday (Holliday, 1964). La résolution des jonctions de Holliday génère la formation de 2 fourches de réplication convergentes, dont la rencontre entraînera la terminaison de la réplication. Une ADN ligase comblera ensuite les brèches de l'ADN afin de finaliser le processus de réparation des cassures double brin de l'ADN (Mawer & Leach, 2014).

D. radiodurans possède les homologues des gènes *ruvA* (dr1274), *ruvB* (dr0596) et *ruvC* (dr0440), le mutant Δ *ruvB* est sensible aux rayonnements γ , UV et au traitement à la mitomycine C (Kitayama et al., 1997)

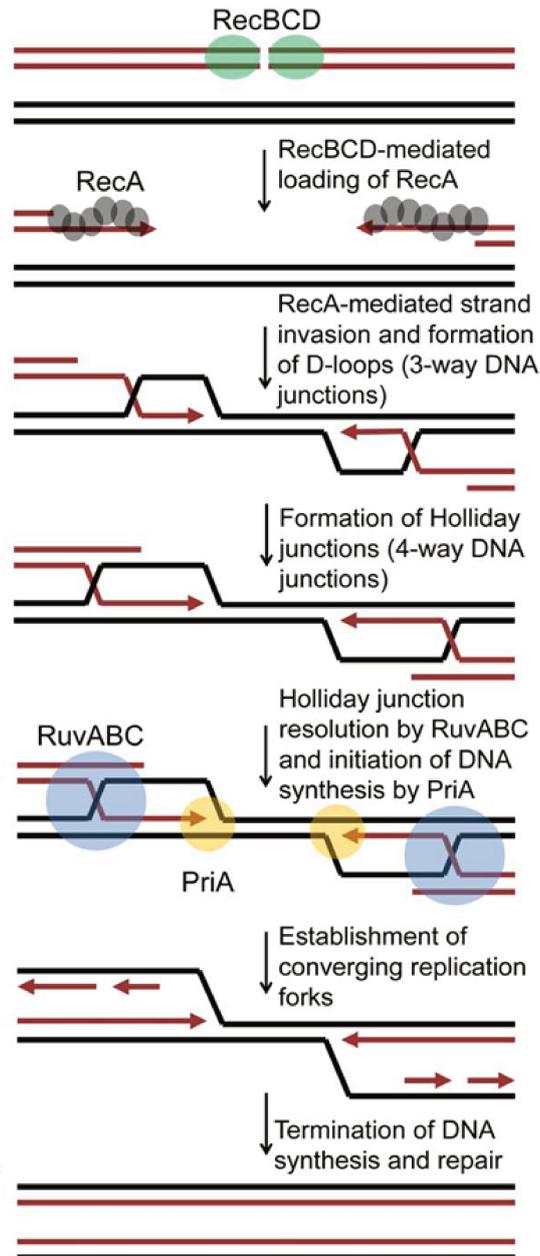


Figure 21: La recombinaison homologue chez *E. coli* (d'après (Mawer & Leach, 2014)).

5°) Le SSA (Single Strand Annealing)

En 1996, Daly et son équipe (Daly & Minton, 1996) ont constaté que dans un mutant $\Delta recA$, une partie des cassures de l'ADN était réparée après exposition au rayonnement γ . Ces observations suggéraient donc qu'un mécanisme de réparation de l'ADN, indépendant de RecA, agit dans les premiers temps de la reconstitution du génome après exposition de *D. radiodurans* au rayonnement γ . Le mécanisme proposé par ces auteurs est le single strand annealing (SSA) (**Figure 22**), qui permet la réparation des cassures double brin de l'ADN,

situées dans la même région chromosomique de deux copies du même chromosome. Après maturation des extrémités des fragments double brin d'ADN, les extrémités 3' simple brin débordantes vont s'apparier avec les séquences simple brin complémentaires situées sur un autre fragment d'ADN et former une région d'ADN double brin. Une ADN polymérase et une ADN ligase combleront ensuite les régions simple brin restantes.

Chez *E. coli*, il a été démontré que la protéine RecO stimule l'appariement des séquences simple brin complémentaires (Kantake et al., 2002). Chez *D. radiodurans*, la protéine RecO présente également une activité d'appariement simple brin (Makharashvili et al., 2004). Cependant, cette activité est plus faible que celle de son homologue chez *E. coli* et la cinétique de reconstitution du génome après exposition au rayonnement γ , du simple mutant $\Delta recO$ est comparable à celle du simple mutant $\Delta recA$, suggérant que RecO ne soit pas impliquée dans un mécanisme, indépendant de RecA, de type SSA. Néanmoins, DdrA et DdrB, deux protéines spécifiques des Deinococcaceae, semblent jouer un rôle important dans la réparation des cassures double brin de l'ADN par SSA (Voir le paragraphe suivant C- Le rôle des protéines spécifiques aux Deinococcaceae).

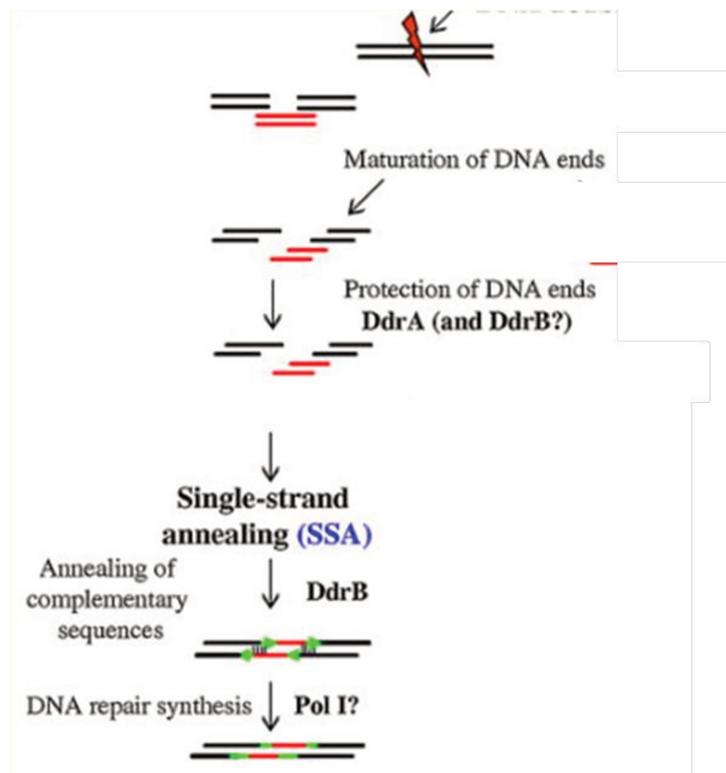


Figure 22: Principe du mécanisme de réparation de l'ADN par SSA (single strand annealing). Les fragments d'ADN générés par les rayonnements γ sont représentés en noir ou rouge. Les lignes vertes indiquent l'ADN nouvellement synthétisé (d'après (Bouthier de la Tour et al., 2011)).

6°) L'ESDSA, un mécanisme original chez D. radiodurans

D. radiodurans possède un mécanisme original, appelé ESDSA pour extended synthesis-dependent strand annealing, jouant un rôle crucial dans la réparation des cassures double brin de l'ADN. Comme pour le mécanisme de réparation de l'ADN par recombinaison homologue, l'ESDSA nécessite la présence d'une copie intacte, en plus de la copie endommagée. Son principe (**Figure 23**) repose sur la synthèse massive d'ADN et l'appariement des fragments complémentaires néosynthétisés. Après maturation des extrémités d'ADN double brin, les extrémités 3' simple brin débordantes sur lesquelles la recombinaison RecA forme un nucléofilament, envahissent la région homologue du fragment chevauchant. Ce dernier servira de matrice, tandis que l'ADN simple brin invasif servira d'amorce pour la synthèse d'ADN, via les ADN polymérase I et III. Les longues extensions d'ADN simple brin, formées lors de la migration de la D-loop, pourront ensuite s'apparier avec d'autres extensions simple brin complémentaires, obtenues par un mécanisme similaire. La reconstitution des chromosomes circulaires se fera ensuite par recombinaison homologue entre les longs fragments engendrés par l'ESDSA (Zahradka et al., 2006). Les chromosomes reconstitués sont alors composés d'un « patchwork » de régions présentes avant l'exposition au rayonnement γ et de régions néosynthétisées lors de la réparation de l'ADN par ESDSA.

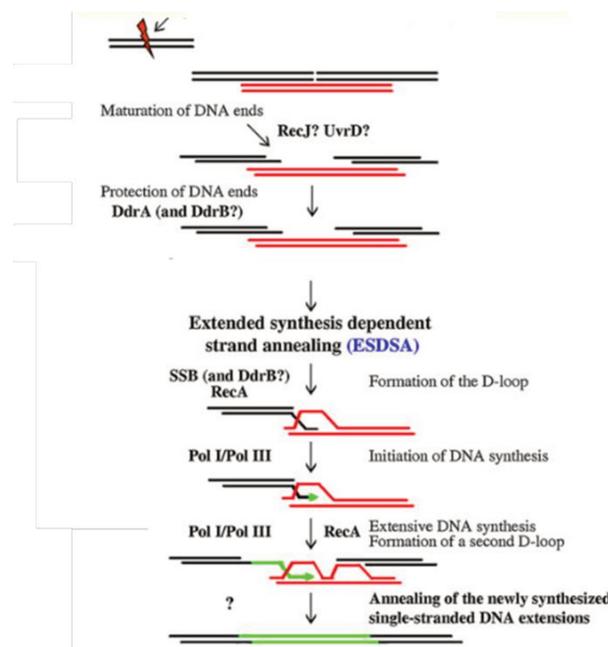


Figure 23: Principe du mécanisme de réparation de l'ADN par ESDSA (extended synthesis-dependent strand annealing) (d'après (Bentchikou et al., 2010; Bouthier de la Tour et al., 2011)).

7°) Le NHEJ chez D. radiodurans ?

Le NHEJ (non homologous end-joining) est un mécanisme de réparation des cassures double brin de l'ADN, indépendant de RecA, qui ne nécessite pas la présence d'un fragment homologue pour réparer la cassure double brin de l'ADN. C'est une voie de réparation majeure chez les eucaryotes, qui récemment, a également été identifiée chez plusieurs espèces bactériennes (*M. tuberculosis*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*) (Gong et al., 2005; Weller et al., 2002; Zhu, Wang & Shuman, 2005).

La première étape (**Figure 24**) de ce processus est la reconnaissance et la fixation des cassures double brin par l'homodimère Ku, qui recrute ensuite la protéine LigD (une protéine multifonctionnelle composée à la fois d'un domaine polymérase, d'un domaine ligase et d'un domaine nucléase). Le domaine polymérase de LigD fixe les extrémités 5' phosphate et induit, avec la protéine Ku, la juxtaposition des extrémités de l'ADN. Les activités nucléase et polymérase de LigD permettent de maturer les extrémités et combler les brèches de l'ADN, l'activité ligase de LigD permet de reformer les liaisons phosphoesters entre les extrémités de l'ADN (Brissett & Doherty, 2009).

D. radiodurans ne possède pas d'homologue des protéines Ku et il n'y a aucune évidence expérimentale de l'existence d'un mécanisme de type NHEJ chez cet organisme.

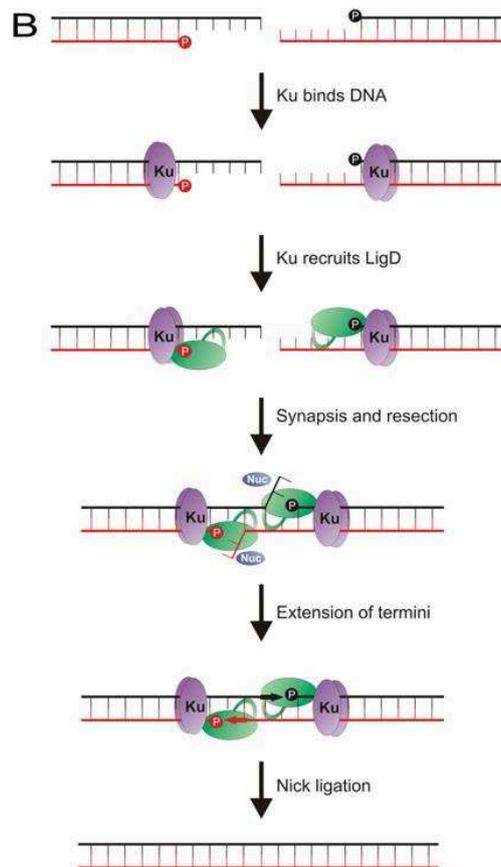


Figure 24 : Mécanisme de réparation de l'ADN par NHEJ décrit chez les procaryotes (d'après (Brissett & Doherty, 2009)).

C- Le rôle des protéines spécifiques aux Deinococcaceae

Les systèmes de réparation de l'ADN de *D. radiodurans* ne semblent pas être plus complexes que ceux identifiés chez des espèces radiosensibles comme *E. coli* ou *Shewanella oneidensis* (Daly, 2009; Daly et al., 2004; Makarova et al., 2001; Makarova et al., 2007) et chez *D. radiodurans*, les mutants lourdement impactés dans la réparation de l'ADN ($\Delta polA$, $\Delta recA$, $\Delta recO$) peuvent être totalement complétés ($\Delta polA/polA_{EC}$) ou partiellement complétés ($\Delta recA/recA_{EC}$ ou $\Delta recO/recO_{EC}$) par les gènes homologues de *E. coli* (Gutman et al., 1994; Schlesinger, 2007; Xu et al., 2008). C'est pourquoi il a été suggéré que certaines protéines spécifiques aux Deinococcaceae, pourraient jouer un rôle clé dans la réparation de l'ADN (Griffiths & Gupta, 2007). Par ailleurs, les analyses transcriptomiques (Tanaka et al., 2004), ont mis en évidence l'induction de 72 gènes après exposition de *D. radiodurans* au rayonnement γ . Les 5 gènes les plus fortement induits sont des gènes spécifiques aux Deinococcaceae (*ddrA*, *ddrB*, *ddrC*, *ddrD* et *pprA*) et leur délétion ($\Delta ddrA$, $\Delta ddrB$, $\Delta pprA$) a permis de mettre en évidence leur rôle crucial dans la radiorésistance de *D. radiodurans* (Tableau 1 et Figure 25).

gène	<i>ddrA</i>	<i>ddrB</i>	<i>ddrC</i>	<i>ddrD</i>	<i>pprA</i>
Facteur d'induction de l'expression	18	13	12	12	15

Tableau 1: Les gènes *ddrA*, *ddrB*, *ddrC*, *ddrD* et *pprA* sont les 5 gènes les plus fortement induits après 1 h d'exposition de *D. radiodurans* au rayonnement γ (3 kGy).

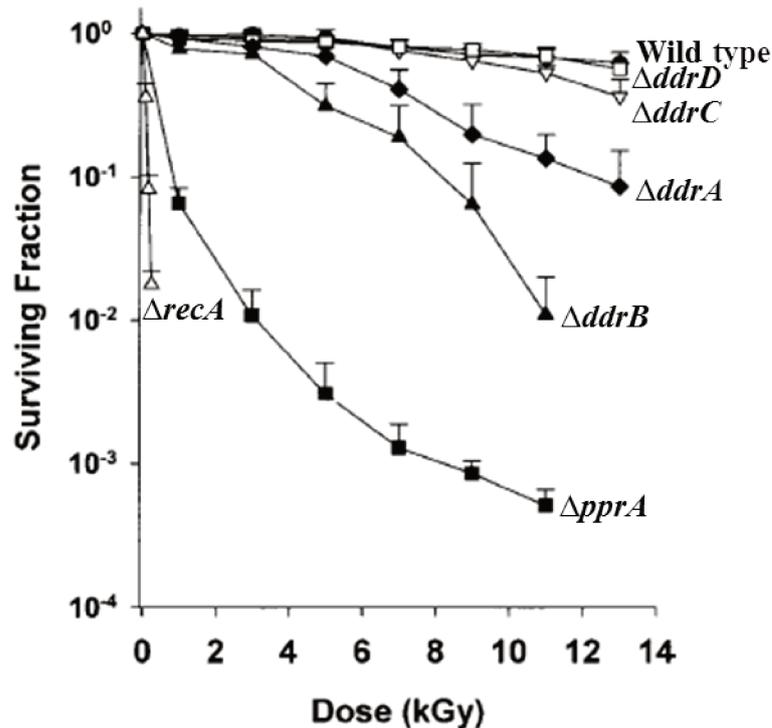


Figure 25: Courbe de survie après exposition au rayonnement γ de la souche sauvage et des mutants ($\Delta ddrA$, $\Delta ddrB$, $\Delta ddrC$, $\Delta ddrD$, $\Delta pprA$ et $\Delta recA$) de *D. radiodurans* (adapté de (Tanaka et al., 2004)).

1°) La protéine PprA

Le gène *pprA* (pleiotropic protein promoting DNA repair A, drA0346) est unique aux Deinococcaceae. Les études de Tanaka M. et de ses collaborateurs ont montré que l'expression du gène *pprA* est induite d'un facteur 15 après exposition des cellules au rayonnement γ et que le mutant $\Delta pprA$ est très sensible aux agents endommageant l'ADN tels que les rayonnements γ (**Figure 25**), UV ou la mitomycine C (à une dose de 9 kGy, 100J/m² le mutant $\Delta pprA$ est respectivement 1000 et 8 fois plus sensible que la souche sauvage) (Narumi et al., 2004; Selvam et al., 2013; Tanaka et al., 2004). Les études in vitro de Narumi et al. (Narumi et al., 2004) montrent que la protéine PprA fixe préférentiellement l'ADN ayant des cassures double brin, inhibe la dégradation de l'ADN par l'exonucléase III de *E. coli* et stimule l'activité ligase de l'ADN ligase de *E. coli*, conduisant les auteurs à suggérer que la protéine PprA pourrait jouer un rôle dans la réparation de l'ADN par un mécanisme de type NHEJ, en agissant comme une protéine Ku-like. Cependant, ce mécanisme n'a pas encore été démontré in vivo chez *D. radiodurans*. Des études plus récentes (Devigne et al., 2013) ne soutiennent pas cette hypothèse. En effet, il a été démontré que le double mutant

$\Delta recA \Delta prrA$ est aussi radiosensible que le simple mutant $\Delta recA$ (Tanaka et al., 2004) et il a également été démontré que les cinétiques très lentes de réparation de l'ADN, d'un simple mutant $\Delta recA$ et du double mutant $\Delta recA \Delta prrA$ sont comparables, ce qui suggère que PprA ne joue pas un rôle clé dans la réparation de l'ADN par un mécanisme RecA indépendant de type NHEJ ou SSA (Devigne et al., 2013).

Dans le mutant $\Delta prrA$, le génome (**Figure 26 B**) est reconstitué efficacement après exposition des cellules au rayonnement γ (3,8 kGy), mais un retard de la réparation de l'ADN d'environ 1h est observé en comparaison avec la souche sauvage (Devigne et al., 2013). Les études du laboratoire ont également montré que le mutant $\Delta prrA$ n'est pas affecté dans la synthèse massive d'ADN, mise en place lors de la réparation des cassures double brin de l'ADN par le mécanisme ESDSA (**Figure 26 A**) (Devigne et al., 2013).

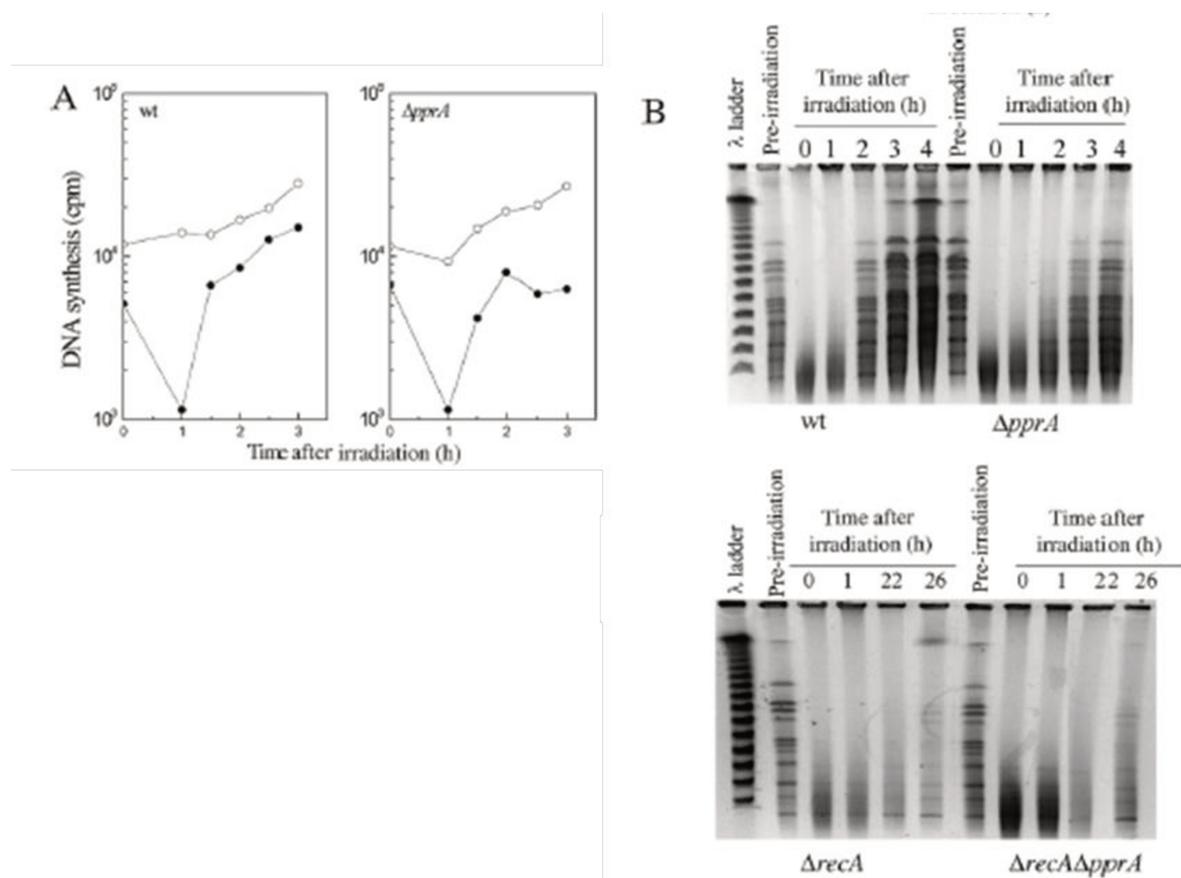


Figure 26: Analyses de la synthèse d'ADN et de la cinétique de réparation des cassures double brin de l'ADN dans la souche sauvage, les simples mutants $\Delta prrA$ et $\Delta recA$ et le double mutant $\Delta recA \Delta prrA$ après exposition des cellules au rayonnement γ (3,8 kGy) (d'après (Devigne et al., 2013)). A) Analyse du taux de synthèse d'ADN à différents temps après exposition des cellules au rayonnement γ dans la souche sauvage et le mutant $\Delta prrA$. Les cellules sont incubées en présence de thymidine tritiée (³H) pendant 15 min afin de mesurer le taux de synthèse global de l'ADN après que les souches soient

exposées (cercles noirs) ou non (cercles blancs) au rayonnement γ (3,8 kGy). B) Cinétique de reconstitution du génome de la souche sauvage, des simples mutants Δ pprA et Δ recA et du double mutant Δ recA Δ pprA après exposition des cellules au rayonnement γ (3,8 kGy), visualisée par le suivi du profil de digestion de l'ADN par NotI par électrophorèse en champ pulsé. Des échantillons de culture sont prélevés à différents temps (0, 1, 2, 3, 4, 22 ou 26 heures) d'incubation après irradiations. Le puit appelé pré-irradiation correspond à de l'ADN provenant de cellules non irradiées.

Par ailleurs, des expériences d'immunolocalisation (**Figure 27**) montrent qu'après exposition au rayonnement γ (3.8 kGy), la protéine PprA est localisée dans le nucléoïde. Elle est ensuite retrouvée au niveau du septum de division (2h après irradiation) puis sous forme d'un fin filament entre les cellules filles (3h après irradiation) (Devigne et al., 2013).

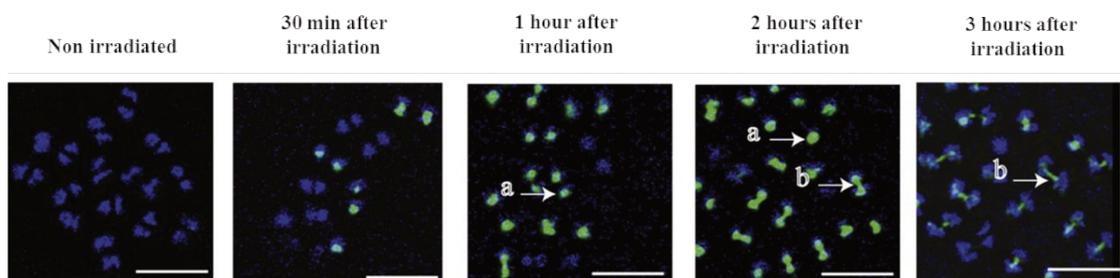


Figure 27: Immunolocalisation de la protéine PprA-HA chez *D. radiodurans* après exposition au rayonnement γ (3.8 kGy). Les cellules exprimant la protéine PprA-HA ont été exposées au rayonnement γ et incubées avec des anticorps anti-HA puis des anticorps secondaires couplés au FITC (vert). Les nucléoïdes sont marqués avec du DAPI (bleu). PprA est localisée a) sous forme de foci dans le nucléoïde ou b) en travers du septum de division. Barre d'échelle: 5 μ m (d'après (Devigne et al., 2013)).

Les analyses au microscope à épifluorescence (**Figure 28**), montrent qu'en conditions standards la morphologie des cellules du mutant Δ pprA est identique à celle de la souche sauvage en revanche, 7h après l'exposition des cellules au rayonnement γ , l'absence de PprA engendre la formation de cellules ayant une morphologie anormale (90%) (cellules anucléées, défauts de ségrégation de l'ADN et/ou cellules élargies). Des expériences de double hybride réalisées chez *E. coli* avec des protéines de *D. radiodurans*, ont montré que PprA interagit avec les 4 protéines ParA identifiées dans le génome de *D. radiodurans* (Maurya et al., 2016). L'ensemble de ces données suggèrent que la protéine PprA est impliquée dans la ségrégation et/ou la division cellulaire après exposition au rayonnement γ (Devigne et al., 2013).

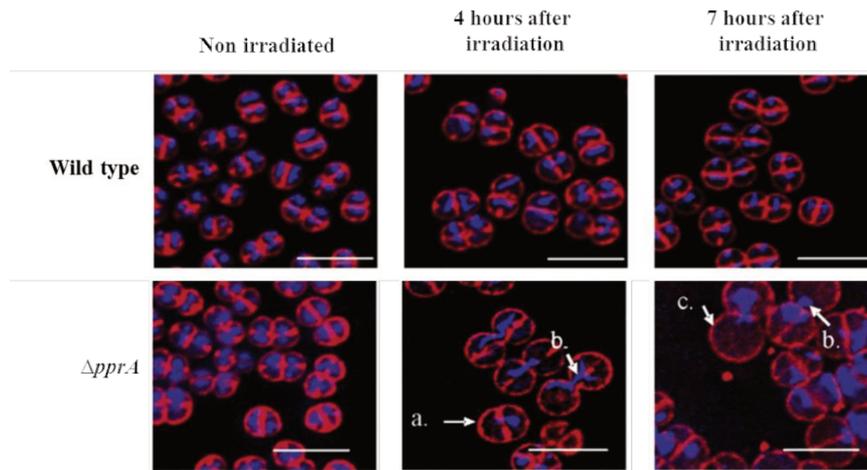


Figure 28: Morphologie des cellules sauvages et du mutant $\Delta pprA$ observées au microscope à épifluorescence avant et après exposition au rayonnement γ (3.8 kGy) (D'après (Devigne et al., 2013)).

La recherche des interactants physiques de PprA, par des expériences de co-Immunoprécipitation avec des extraits protéiques issus de cellules irradiées, a permis de montrer que la protéine PprA interagit avec les sous-unités A et B de l'ADN gyrase (Devigne et al., 2016; Kota, Charaka & Misra, 2014a).

D. radiodurans possède 2 gènes codant les deux sous-unités de l'ADN gyrase (*gyrA*: dr1913 et *gyrB*: dr0906) et un gène *topIA* (dr1374) codant la topoisomérase IA, en revanche aucun gène codant pour l'ADN topoisomérase IV et l'ADN topoisomérase III n'a été identifié. L'ADN gyrase de *D. radiodurans* possède, in vitro, des activités de décaténation et de surenroulement négatif de l'ADN (Devigne et al., 2016).

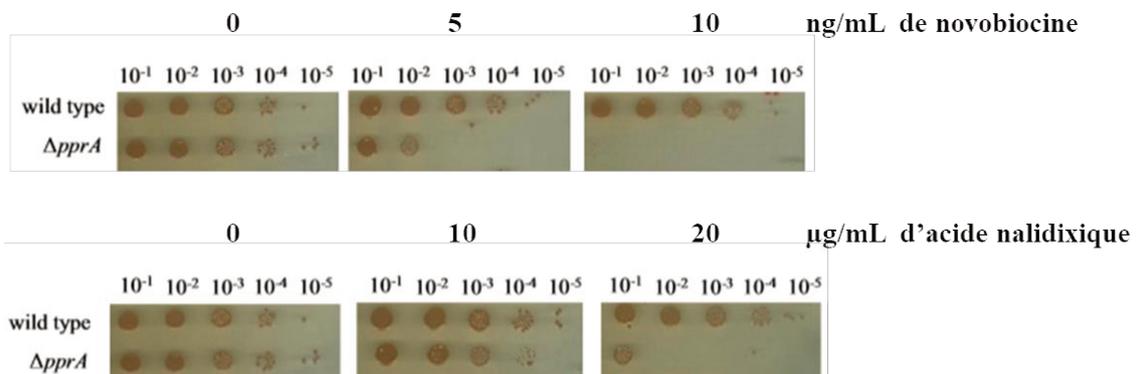


Figure 29: Tests de sensibilité aux inhibiteurs de l'ADN gyrase (novobiocine et acide nalidixique). Des dilutions sérielles des cultures du mutant $\Delta pprA$ et de la souche sauvage sont déposées sur un milieu TGY agar en présence ou non de novobiocine (5 ou 10 ng/mL) ou d'acide nalidixique (10 ou 20 $\mu\text{g/mL}$) (d'après (Devigne et al., 2016)).

d'ADN gyrase avec du kDNA en présence de concentrations croissantes de PprA. SC: ADN surenroulé, R: ADN relâché, MC: minicercles, CI: intermédiaires de décaténation (d'après (Devigne et al., 2016)).

2°) La protéine DdrA

La délétion de *ddrA* (DNA damage response gene A: dr0423) sensibilise *D. radiodurans* aux agents génotoxiques (**Figure 25**) (rayonnement γ , mitomycine C) (Tanaka et al., 2004) et engendre une dégradation massive de l'ADN après exposition au rayonnement γ , empêchant la reconstitution de son génome en absence de nutriments (Harris et al., 2004). Le double mutant $\Delta recA \Delta ddrA$ est plus radiosensible que le simple mutant $\Delta recA$, suggérant que DdrA agit dans un mécanisme de réparation de l'ADN indépendant de RecA (Harris et al., 2004). Les analyses bioinformatiques montrent que la protéine DdrA est un homologue de la protéine eucaryote Rad52 et des expériences *in vitro*, montrent que DdrA fixe l'ADN simple brin avec une affinité importante pour les extrémités 3' simple brin et les protègent de la dégradation par les nucléases (Harris et al., 2004). L'ensemble de ces données démontrent que la protéine DdrA est un acteur majeur dans la réparation de l'ADN et le maintien de l'intégrité du génome chez *D. radiodurans*, et suggèrent que DdrA intervient dans la protection de l'ADN, via son rôle dans la protection des extrémités simple brin générées par l'irradiation. Il a également été proposé que DdrA assure 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). Jolivet E. et ses collaborateurs, ont montré que l'absence de DdrA, dans un contexte cellulaire où RecA est en quantité limitante, augmente significativement la sensibilité au rayonnement γ comparé au simple mutant $\Delta ddrA$ alors que la surexpression de RecA, dans un contexte $\Delta ddrA$ restaure en partie la radiorésistance d'un simple mutant $\Delta ddrA$, suggérant que la polymérisation de RecA sur l'ADN simple brin puisse les protéger de la dégradation ou alors, que la réparation rapide des cassures en présence de concentration élevée de protéine RecA ne nécessite plus la protection des intermédiaires de recombinaison par DdrA (Jolivet et al., 2006).

3°) La protéine DdrB

Comparé à la souche sauvage, le mutant $\Delta ddrB$ (DNA damage response gene B: dr0070) est très sensible aux fortes doses de rayonnement γ (**Figure 25**) (Tanaka et al., 2004). La protéine DdrB forme une structure pentamérique particulière (Norais et al., 2009) en forme d'anneau et possède les caractéristiques des protéines SSB (single-strand DNA binding

protein) (Sugiman-Marangos & Junop, 2010), avec une structure cœur stable ayant de l'homologie avec le domaine OB-fold (oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold domain), qui est impliqué dans la fixation de l'ADN simple brin (Murzin, 1993) et une région flexible au niveau du domaine C-terminal finissant par le motif EETPF, qui est très similaire au motif DDIPF conservés dans les protéines SSB (Norais et al., 2009). Chez *E. coli* et *B. subtilis*, cette région C-terminale est essentielle pour le recrutement à l'ADN des protéines du métabolisme de l'ADN (Shereda et al., 2008). Chez *D. radiodurans*, la délétion du domaine C-terminal de DdrB ne sensibilise pas les cellules au rayonnement γ , suggérant qu'il ne joue pas un rôle crucial dans le recrutement des protéines de réparation de l'ADN au niveau des lésions de l'ADN (Bouthier de la Tour et al., 2011).

Les expériences de retard sur gel et de microscopie électronique montrent que DdrB fixe spécifiquement l'ADN simple brin, en le recouvrant sous une forme similaire à un collier de perles (Norais et al., 2009). L'ADN simple brin étant plus susceptible d'être dégradé par les nucléases que l'ADN double brin, il a été proposé que la protéine DdrB, en couvrant l'ADN simple brin, permette de le protéger de la dégradation et participe ainsi au maintien de l'intégrité du génome après exposition des cellules au rayonnement γ (Bouthier de la Tour et al., 2011; Norais et al., 2009; Xu et al., 2010).

Contrairement aux autres protéines SSB, DdrB stimule *in vitro* l'appariement des fragments d'ADN simple brin complémentaires (Xu et al., 2010), suggérant que DdrB intervienne dans le mécanisme de réparation de l'ADN par SSA. Cette hypothèse est renforcée par les résultats de Tanaka et al. (Tanaka et al., 2004), qui montrent qu'à une dose de 260 Gy, le double mutant $\Delta\text{ddrB } \Delta\text{recA}$ est 50 fois plus sensible au rayonnement γ que le simple mutant ΔrecA . De plus, le suivi de la cinétique de réparation du génome après exposition au rayonnement γ montre que la lente réparation des cassures double brin de l'ADN observé chez le simple mutant ΔrecA est totalement abolie chez le double mutant $\Delta\text{recA}\Delta\text{ddrB}$, suggérant que la protéine DdrB joue un rôle majeur dans un mécanisme de réparation RecA-indépendant, à savoir la réparation des cassures de l'ADN par SSA (Xu et al., 2010). La réparation des cassures double brin de l'ADN est retardée de 1h dans un mutant ΔddrB par rapport à une souche sauvage et il a été suggéré qu'un mécanisme de réparation de l'ADN de type SSA puisse intervenir précocément afin de réduire le nombre de petits fragments d'ADN avant l'initiation de leur réparation par ESDSA ou recombinaison homologue (Bouthier de la Tour et al., 2011; Xu et al., 2010). En effet, des expériences d'immunolocalisation montrent qu'après exposition des cellules de *D. radiodurans* au rayonnement γ , la protéine DdrB est

induite et recrutée au nucléoïde avant la protéine RecA, suggérant que le mécanisme de réparation de l'ADN par SSA soit impliqué dans les premières étapes de la réparation des cassures double brin de l'ADN chez *D. radiodurans* (Basu & Apte, 2012; Bouthier de la Tour et al., 2011; Xu et al., 2010).

De plus, l'étude de Bouthier et al. (Bouthier de la Tour et al., 2011) a également mis en évidence le rôle essentiel de DdrB lors de la transformation plasmidique chez *D. radiodurans* afin de reconstituer à partir de fragments d'ADN simple brin, un ADN plasmidique circulaire double brin par appariement simple brin (voir paragraphe précédent *D. radiodurans*, une bactérie naturellement transformable).

4°) La protéine DdrC

La délétion du gène *ddrC* (A2G07_003810) a un faible effet, en comparaison avec la souche sauvage, sur la survie cellulaire après exposition des cellules au rayonnement γ ou à la mitomycine C (**Figure 25**, Tanaka et al., 2004). En revanche, il a été démontré que la délétion de *ddrC* augmente la sensibilité au rayonnement γ du mutant $\Delta recA$ (Tanaka et al., 2004). De plus, la délétion de *ddrC* augmente la sensibilité au rayonnement γ et UV du simple mutant $\Delta ddrB$ (Selvam et al., 2013; Tanaka et al., 2004). Ces données suggèrent que DdrC pourraient, dans certains contextes génétiques, jouer un rôle important dans les mécanismes de réparation de l'ADN chez *D. radiodurans* (Selvam et al., 2013, Tanaka et al., 2004).

Très récemment, une étude (Bouthier de la Tour et al., 2017) menée au laboratoire et à laquelle j'ai participé, a caractérisé *in vitro* et *in vivo* la protéine DdrC afin de mieux comprendre sa fonction biologique dans les cellules irradiées. Cette étude a montré que la protéine DdrC est rapidement induite et recrutée au nucléoïde après exposition de *D. radiodurans* au rayonnement γ (5 kGy). Nous avons démontré que l'induction de l'expression de DdrC était dépendante de la métalloprotéase IrrE et du répresseur transcriptionnel DdrO. Des expériences *in vitro* ont montré que la protéine DdrC fixe l'ADN simple et double brin avec une préférence pour l'ADN simple brin. De plus, DdrC protège l'ADN de la dégradation par les nucléases, stimule l'appariement des fragments d'ADN simple brin complémentaires et induit la circularisation d'un ADN plasmidique linéaire. Des analyses par microscopie électronique à transmission ont également montré que la protéine DdrC condense l'ADN. Il a par ailleurs été démontré que le mutant $\Delta ddrC$ est 10 fois plus sensible que la souche sauvage à l'exposition des cellules à une dose de 750 J/m² et que l'absence de DdrC augmente significativement la sensibilité au rayonnement UV des mutants $\Delta uvrA$ ou $\Delta uvrE$ (à une dose

de 500 J/m^2 , le double mutant $\Delta\text{ddrC}\Delta\text{uvsE}$ est 50 fois plus sensible que le mutant ΔuvsE et à une dose de 750 J/m^2 , le double mutant $\Delta\text{ddrC}\Delta\text{uvrA}$ est 10 fois plus sensible que le simple mutant ΔuvrA).

L'ensemble de ces données montre que DdrC est une nouvelle protéine de fixation à l'ADN, qui contribue à la réparation des dommages de l'ADN, en limitant la dégradation massive de l'ADN et la dispersion des extrémités des fragments d'ADN après exposition à de fortes doses de rayonnements γ ou UV ((Bouthier de la Tour et al., 2017) en annexe).

D- La structure compacte du nucléoïde

L'observation par microscopie à épifluorescence (**Figure 31**), montre que les nucléoïdes des organismes radiorésistants (*D. radiodurans*, *D. grandis*, *D. murrayi*, *D. radiopugnans*, *D. geothermalis*, *Rubrobacter radiotolerans*...) sont plus compacts que ceux des organismes radiosensibles (*E. coli*, *Thermus aquaticus*) dans lesquels l'ADN est plus diffus dans la cellule. Par ailleurs, la structure compacte du nucléoïde de *D. radiodurans* est maintenue après exposition des cellules à une dose de 5 kGy (Zimmerman & Battista, 2005).

Il a donc été proposé que la structure compacte du nucléoïde de *D. radiodurans* puisse contribuer à la radiorésistance de cette bactérie. En effet, la structure compacte du nucléoïde, pourrait éviter la dispersion des fragments d'ADN après irradiation afin de faciliter la mise en œuvre des mécanismes de réparation de l'ADN (Levin-Zaidman et al., 2003; Zimmerman & Battista, 2005).

Levin-Zaidman S. et ses collaborateurs ont émis l'hypothèse que la forme en anneau du nucléoïde soit la clé de la radiorésistance de *D. radiodurans* (Levin-Zaidman et al., 2003), en revanche cette hypothèse est controversée étant donné les analyses de microscopie par épifluorescence de Zimmerman J. et Battista J. qui ont montré que la forme en anneau du nucléoïde n'est pas observée chez plusieurs organismes radiorésistants (*D. radiopugnans*, *D. geothermalis*...) (**Figure 31**), ce qui suggère que la forme du nucléoïde en anneau observée chez *D. radiodurans*, *D. radiophilus*, *D. grandis*, *D. murrayi*..., ne soit pas essentielle à la radiorésistance (Zimmerman & Battista, 2005).

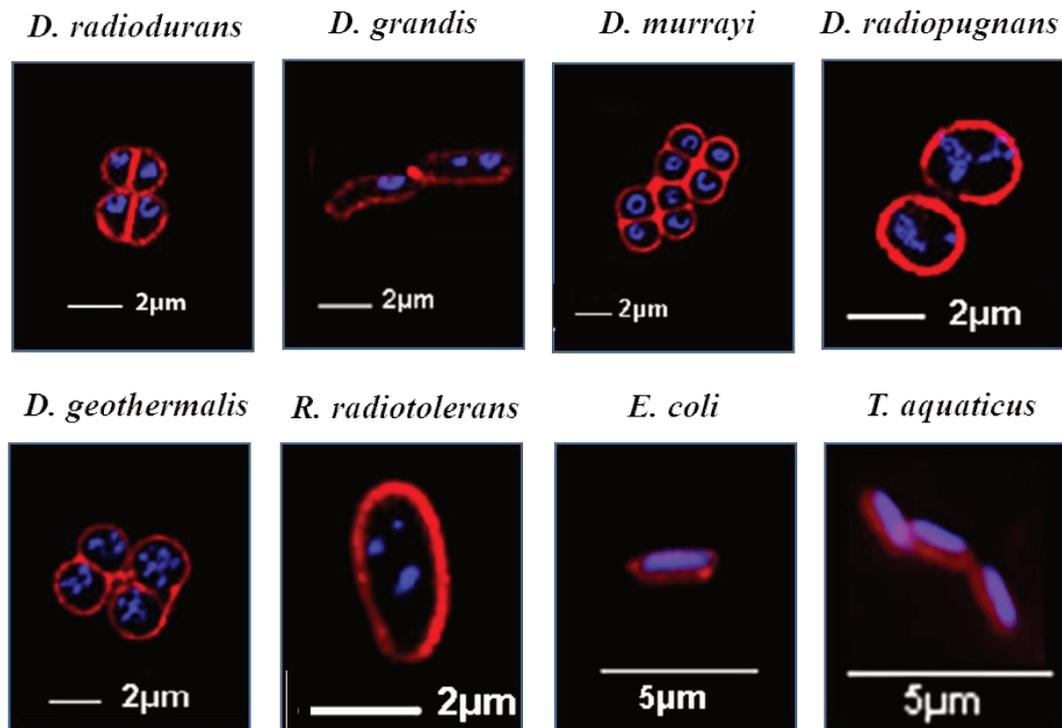


Figure 31: Structure du nucléoïde des espèces radiorésistantes (*D. radiodurans*, *D. grandis*, *D. murrayi*, *D. radiopugnans*, *D. geothermalis*, *Rubrobacter radiotolerans*) et des espèces radiosensibles (*E. coli* et *T. aquaticus*). Les membranes sont marquées avec du FM4-64 (rouge) et les nucléoïdes avec du DAPI (bleu) (adapté de (Zimmerman & Battista, 2005)).

Chez les procaryotes, les nucléoïdes sont organisés et compactés par un réseau d'interaction entre les protéines associées au nucléoïde, que l'on appelle les NAPs (nucleoid-associated proteins), les protéines de la famille SMC (structural maintenance of chromosome) et les ADN topoisomérasés. Chez *E. coli*, 12 NAPs ont été identifiées : la protéine histone-like HU (heat-unstable protein), DnaA (DNA-binding protein A), les protéines IHF (integration host factor), la protéine H-NS (heat-stable nucleoid-structuring protein), la protéine Fis (factor for inversion stimulation), la protéine Lrp (leucine-responsive regulatory protein), les protéines CbpA et CbpB (curved DNA-binding protein A and B), la protéine Hfq (host factor for phage Q), la protéine IciA (inhibitor of chromosome initiation A), les protéines Dps (DNA protection during starvation) et la protéine StpA (suppressor of τ phenotype A) (Azam & Ishihama, 1999). Parmi ces protéines NAPs, *D. radiodurans* possède seulement un homologue de la protéine DnaA (dr0002), de la protéine histone-like HU (drA0065) et 2 protéines homologues à la protéine Dps de *E. coli* : Dps1 (dr2263) et Dps2 (drB0092) (Touaille et al., 2012). *D. radiodurans* possède également 3 protéines appartenant à la famille SMC dont le rôle est expliqué dans le chapitre 2°).

Chez *E. coli*, des études ont montré que la protéine histone-like HU et les protéines Dps ont un rôle important dans la compaction du nucléoïde (Drlica & Rouviere-Yaniv, 1987; Frenkiel-Krispin et al.; Kim et al., 2004b; Rouviere-Yaniv, Yaniv & Germond, 1979). Chez *D. radiodurans*, la protéine HU est essentielle à la survie cellulaire en conditions standards et sa déplétion progressive entraîne une décondensation et un fractionnement en plusieurs entités du nucléoïde suivie de la mort de la cellule (Nguyen et al., 2009). La délétion des deux gènes *dps* (Δ *dps1* Δ *dps2*) n'altère ni la compaction du nucléoïde, ni la radiorésistance de *D. radiodurans* (Nguyen et al., 2009). In vitro, la protéine Dps1 fixe l'ADN avec une affinité élevée et favorise la compaction de l'ADN (Bhattacharyya & Grove, 2007; Reon et al., 2012).

Wang et al. (Wang et al., 2012), ont identifié, chez *D. radiodurans*, un nouveau membre des protéines NAPs, le gène *dr0199* (un orthologue d'*EbfC*, une nouvelle protéine découverte chez *Borrelia burgdorferi*, fixant l'ADN double brin de manière non spécifique (Riley et al., 2009). La délétion du gène *dr0199* sensibilise *D. radiodurans* aux rayonnements γ , UV et au stress oxydant généré par l' H_2O_2 (lorsque les cellules sont exposées à une dose de 10 kGy, 100 J/m² ou 50 mM d' H_2O_2 , le mutant Δ *dr0199* est respectivement 6, 8 et 10 fois plus sensible que la souche sauvage). La protéine Dr0199 est localisée au niveau du nucléoïde et des expériences, in vitro, montrent que Dr0199 est une protéine de fixation à l'ADN, qui protège l'ADN de l'action des radicaux hydroxyles et de la dégradation par la DNase I. De plus, il a été démontré que Dr0199 diminue l'action de relâchement de la topoisomérase I sur de l'ADN plasmidique surenroulé, suggérant que cette protéine joue un rôle dans l'organisation de l'ADN et la structure de la chromatine (Wang et al., 2012).

Alors que *D. radiodurans* et *D. deserti* possèdent un nucléoïde compact, comparé aux autres espèces bactérienne, ils ne semblent posséder qu'une faible variété de protéines NAPs. Une approche protéomique a été réalisée dans le but d'identifier d'éventuelles nouvelles protéines impliquées dans la condensation du nucléoïde chez *D. radiodurans* et *D. deserti* (Toueille et al., 2012). La protéine HU et les sous-unités A et B de l'ADN gyrase ont été identifiées comme étant les protéines majeures associées au nucléoïde de ces 2 espèces de Deinococcaceae et aucune protéine spécifique aux Deinococcaceae n'a été détectée. Il a donc été proposé que la structure compacte du nucléoïde résulte de l'absence des autres protéines NAPs qui pourraient moduler l'activité de condensation de la protéine HU et de l'ADN gyrase. En effet, *D. radiodurans* et *D. deserti* sont dépourvus de protéine Fis. Chez *E. coli*, il a été démontré que la diminution de la concentration de la protéine Fis est impliquée dans la condensation du nucléoïde en phase stationnaire. De plus, il a été démontré chez *E. coli* que la

protéine Fis réprime l'expression des gènes *gyrA*, *gyrB* et *topA* (Ohniwa et al., 2006). En absence de Fis, l'ADN gyrase et l'ADN topoisomérase I modifient la topologie de l'ADN ce qui résulte en une condensation du nucléoïde.

Par ailleurs, une autre étude (de la Tour et al., 2013) visant à identifier les protéines recrutées au nucléoïde après exposition au rayonnement γ , a montré que les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (SSB, les sous-unités A et B de l'ADN gyrase, l'ADN topoisomérase I, RecA, UvrA, RecQ, DdrA, DdrB et DdrD) sont retrouvées en quantité plus importante dans le nucléoïde de *D. radiodurans* et de *D. deserti* après irradiation.

Enfin il avait été supposé que les 4 à 10 copies du génome de *D. radiodurans* soient pré-alignées afin de faciliter la recherche d'homologie lors de la réparation de l'ADN par recombinaison homologue ou par l'ESDSA (Minton, 1994; Minton & Daly, 1995).

Afin de tester cette hypothèse, la localisation de 3 locus du chromosome I, a été analysée par des expériences de microscopie à épifluorescence, avant et après exposition des cellules au rayonnement γ . Ces expériences ont démontré qu'avant irradiation, les 4 à 8 copies du chromosome 1 ne sont pas pré-alignées mais dispersées dans le nucléoïde, réfutant ainsi l'hypothèse du pré-alignement des chromosomes pour faciliter la réparation de l'ADN. Après irradiation, l'organisation du nucléoïde est modifiée avec un alignement transitoire des loci dans les temps tardifs de la réparation de l'ADN et un retard de la ségrégation du locus Ter a été constaté (Passot et al., 2015).

3°) Régulation de la réponse au stress chez D. radiodurans

Comme décrit précédemment, la radiorésistance de *D. radiodurans* implique de nombreux mécanismes incluant des systèmes efficaces de réparation de l'ADN, une structure compacte du nucléoïde, des systèmes de protection contre le stress oxydant et la présence des protéines spécifiques aux Deinococcoceae, qui jouent un rôle clé dans la radiorésistance. Un des enjeux actuel est de décrypter les réseaux de régulations impliqués dans les réponses cellulaires mises en place chez *D. radiodurans* pour faire face à un stress génotoxique et identifier ainsi l'ensemble des acteurs contribuant à sa radiorésistance. Les analyses transcriptomiques montrent que *D. radiodurans* induit l'expression de nombreux gènes (72 gènes à une dose de 3 kGy) en réponse au rayonnement γ , ce qui résulte en un changement global du profil d'expression des gènes de *D. radiodurans* (Tanaka et al., 2004).

A- Les régulateurs transcriptionnels

Parmi la centaine de gènes annotés en tant que régulateurs transcriptionnels chez *D. radiodurans*, seulement quelques-uns d'entre eux ont été caractérisés.

1°) LexA1 et LexA2: une réponse SOS chez D. radiodurans ?

Chez *E. coli*, le système SOS est régulé par 2 protéines clés : RecA et LexA. En conditions standards, le répresseur transcriptionnel LexA réprime l'expression des gènes du régulon SOS. Après un stress génotoxique, les cellules subissent des lésions de l'ADN, ce qui induit un blocage de la réplication de l'ADN. La protéine RecA forme un nucléofilament sur l'ADN simple brin engendré par l'arrêt local de la réplication, ce qui active son activité co-protéase qui stimule l'activité auto-protéolytique du répresseur LexA. La protéine LexA clivée devient non fonctionnelle, ce qui conduit à la dérégulation du régulon SOS comprenant une quarantaine de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (*uvrAB*, *recA*, *recN*, *recQ*, *ruvABC*...) (Butala, Zgur-Bertok & Busby, 2009; Kreuzer, 2013; Little & Mount, 1982).

Le génome de *D. radiodurans* contient 2 homologues du gène *lexA*, *lexA1* (*drA0344*) et *lexA2* (*drA0074*). L'alignement des séquences protéiques montre que, comme LexA de *E. coli*, LexA1 et LexA2 sont composés d'un domaine de fixation à l'ADN en N-terminal et d'un domaine C-terminal impliqué dans la réaction d'auto-clivage. L'alignement des séquences protéiques des protéines LexA de *E. coli*, *B. subtilis* et *D. radiodurans* indique que le site de clivage Ala-Gly (acides aminés 83 et 84 dans LexA de *D. radiodurans*) et les deux acides

aminés Ser119 et Lys158 localisés dans le site catalytique sont conservés entre ces 3 protéines (Narumi et al., 2001). L'introduction de mutation Gly84 ->Asp84 ou Lys158->Arg158 dans la protéine LexA1 de *D. radiodurans* empêche son auto-clivage stimulé par RecA (Jolivet et al., 2006). Comme chez *E. coli*, RecA stimule in vitro l'activité auto-protéolytique de LexA1 et LexA2 (Narumi et al., 2001; Satoh et al., 2006), il a été démontré qu'après exposition des cellules au rayonnement γ (6,8 kGy), la concentration de LexA1 diminue d'un facteur 10 (Jolivet et al., 2006).

Contrairement à *E. coli*, LexA1 et LexA2 ne participe pas à la régulation de l'expression de la protéine RecA, suggérant que leurs rôles chez *D. radiodurans* soient différents de celui de LexA de *E. coli* (Bonacossa de Almeida et al., 2002; Narumi et al., 2001; Sheng et al., 2004).

L'absence de LexA1 ne diminue pas significativement la radiorésistance de *D. radiodurans* ni la cinétique de réparation de l'ADN après exposition des cellules au rayonnement γ (Narumi et al., 2001; Sheng et al., 2004). En revanche, la délétion de *lexA1* provoque une agrégation des cellules, suggérant que LexA1 contrôle l'expression de gènes impliqués dans la division cellulaire (Bonacossa de Almeida et al., 2002). Les études de Satoh et al. (Satoh et al., 2006), ont montré que le simple mutant Δ lexA2 et le double mutant Δ lexA1 Δ lexA2 sont plus radiorésistants que la souche sauvage. Ils ont par ailleurs démontré, qu'en comparaison avec la souche sauvage, l'activité du promoteur du gène *pprA* est augmentée d'un facteur 1,5 après exposition au rayonnement γ dans un mutant Δ lexA2. Une approche protéomique montre qu'en conditions standards, LexA2 joue un rôle dans la régulation positive ou négative de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des carbohydrates, des lipides, des ions inorganiques, dans les mécanismes de transcription, traduction et le métabolisme des protéines (Sheng et al., 2004).

2°) OxyR et OxyR₂, deux régulateurs transcriptionnels senseurs du stress oxydant

Les bactéries ont développé des systèmes pour détecter et se protéger contre le stress oxydant. Chez *E. coli*, des études ont mis en évidence le rôle crucial de la protéine OxyR comme protéine senseur des ROS. OxyR est un régulateur transcriptionnel appartenant à la famille LysR. Le peroxyde d'hydrogène active OxyR, en induisant la formation d'un pont disulfure entre 2 résidus cystéines conservés (C199 et C208) (Lee et al., 2004; Zheng, Aslund & Storz, 1998). La forme oxydée d'OxyR est ensuite responsable de l'induction de l'expression des systèmes de défense contre le stress oxydant (catalase *katG*, thioredoxine,

glutathione réductase...). L'ensemble des gènes contrôlés par OxyR est appelé le régulon OxyR, il comprend une trentaine de gènes (Storz & Imlay, 1999).

D. radiodurans possède 2 homologues de la protéine OxyR: OxyR (dr0615) et OxyR₂ (drA0336). Les études de Chen et Yin et leurs collaborateurs ont montré que les protéines OxyR et OxyR₂ jouent un rôle important dans la réponse au stress oxydant chez *D. radiodurans* (Chen et al., 2008; Yin et al., 2010). En effet, la délétion du gène *oxyR* ou *oxyR₂* entraîne une augmentation importante de la sensibilité au peroxyde d'hydrogène et il a été démontré qu'en comparaison avec la souche sauvage, les simples mutants Δ *oxyR* et Δ *oxyR₂* accumulent une concentration intracellulaire de ROS plus importante. Dans le double mutant Δ *oxyR* Δ *oxyR₂* tous les phénotypes sont plus accentués (augmentation de la sensibilité au peroxyde d'hydrogène, augmentation de la concentration intracellulaire de ROS, en comparaison avec les simples mutants), démontrant que les 2 protéines (OxyR et OxyR₂) peuvent se substituer l'une de l'autre. Les protéines OxyR et OxyR₂ sont également impliquées dans l'augmentation de l'activité catalase globale après traitement des cellules au peroxyde d'hydrogène (Chen et al., 2008; Yin et al., 2010). Contrairement à la plupart des homologues OxyR déjà étudiés, la comparaison des séquences protéiques montre qu'une seule des 2 cystéines conservées (C208) est retrouvée dans les protéines OxyR et OxyR₂ et les expériences de mutagenèse dirigée confirment que les cystéines C208 d'OxyR et OxyR₂ sont également des cystéines senseurs chez *D. radiodurans*, jouant un rôle crucial dans l'activation d'OxyR et OxyR₂ après traitement des cellules au peroxyde d'hydrogène.

Chez *D. radiodurans*, les analyses transcriptomiques et de RT-qPCR montrent que 280 gènes sont régulés de manière directe ou indirecte par OxyR. Après traitement des cellules au peroxyde d'hydrogène, OxyR est impliquée dans l'induction de l'expression du gène codant la catalase *katE*, des gènes impliqués dans le transport du fer (drB0125, dr1219...) et de plusieurs N-acétyltransférases dont le rôle dans la protection contre le stress oxydant a déjà été démontré chez *Saccharomyces cerevisiae* (Du & Takagi, 2007). OxyR est également impliquée dans la répression de l'expression des gènes *dps*, et des gènes impliqués dans le transport du manganèse (*mntH*) (Chen et al., 2008).

Dans un mutant Δ *oxyR₂*, après traitement des cellules au peroxyde d'hydrogène, les auteurs ont constaté, une diminution de l'expression de 2 flavoprotéines (dr0970, dr0971) et de gènes impliqués dans le transport du fer (dr1219...). Les flavoprotéines sont considérées comme des sources majeures génératrices des ROS via la chaîne respiratoire (Ghosal et al., 2005), il a donc été proposé que la diminution de l'expression des 2 flavoprotéines pourrait être une

réponse compensatoire à l'augmentation des ROS intracellulaires dans le mutant Δ oxyR₂. De plus, il a également été constaté dans le mutant Δ oxyR, en réponse à une augmentation de la concentration en peroxyde d'hydrogène, une diminution de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le transport des électrons (NADH déshydrogénase, cytochrome oxydase...), ce qui permettrait également de manière indirecte de diminuer la production de ROS endogènes via la chaîne respiratoire (Chen et al., 2008; Yin et al., 2010).

3°) Les protéines Dr2539 et Dr0865 sont impliquées dans l'homéostasie des ions Mn^{2+}/Fe^{2+} .

Le rôle crucial des ions manganèse Mn^{2+} dans la détoxification des ROS, a été démontré chez *D. radiodurans* (Leibowitz, Schwartzberg & Bruce, 1976). Les ions Mn^{2+} , en plus de leur rôle dans la protection contre le stress oxydant, sont des cofacteurs essentiels de plusieurs enzymes, cependant des concentrations trop importantes d'ions Mn^{2+} peuvent être toxiques pour la cellule. En effet, chez *Bacillus stearothermophilus*, il a été démontré qu'un excès d'ions manganèse Mn^{2+} perturbe l'homéostasie du calcium et inhibe la synthèse des ARN et des protéines (Cheung H.-Y. , 1982), c'est pourquoi l'homéostasie du manganèse doit être contrôlée. Chez *D. radiodurans*, 2 types de transporteurs du manganèse ont été identifiés : un transporteur de la famille NRAMP (natural resistance associated macrophage protein) (MntH: Dr1709), des transporteurs de type ABC (ATP binding cassette) (Dr2283, Dr2284, Dr2523) et une pompe à efflux du manganèse (MntE: Dr1236) a également été décrite (Ul Hussain Shah et al., 2014). Chez les bactéries *E. coli* et *B. subtilis*, pour maintenir l'homéostasie des ions Mn^{2+} et Fe^{2+} , l'absorption du manganèse et du fer est contrôlée par des régulateurs transcriptionnels de la famille DtxR (diphtheria toxin repressor) ou Fur (ferric uptake repressor) (Glasfeld et al., 2003; Patzer & Hantke, 2001). *D. radiodurans* possède 2 régulateurs transcriptionnels : Dr2539 (une protéine de la famille DtxR) et Dr0865 (une protéine de la famille Fur), L'implication de ces 2 régulateurs transcriptionnels (Dr2539 et Dr0865) dans le maintien de l'homéostasie des ions Mn^{2+}/Fe^{2+} a été démontré chez *D. radiodurans* (Chen et al., 2010b; Liu et al., 2014; Sun et al., 2012; Ul Hussain Shah et al., 2014).

Le mutant Δ Dr2539 ne présente pas de défaut de croissance en conditions standards de culture. En revanche, comparé à la souche sauvage, il est 6 fois plus résistant à une concentration de 50 mM de peroxyde d'hydrogène, suggérant que Dr2539 est un régulateur négatif des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant. Les analyses transcriptomiques et de RT-qPCR, montrent qu'en conditions standards, Dr2539 régule l'expression de 117

gènes, impliqués dans le transport et le métabolisme des ions, des acides aminés et des carbohydrates. L'expression de 53 gènes est diminuée et l'expression de 64 gènes est augmentée dans un mutant Δ dr2539 en comparaison avec la souche sauvage. Dr2539 régule négativement l'expression de deux transporteurs du manganèse: Dr2283, Dr2284, de la catalase KatE (Dr1998) et des protéines spécifiques aux Deinococcaceae, impliquées dans la réparation de l'ADN (DdrB, DdrC, PprA...). Dr2539 active également l'expression de Dr1219 et Drb0125, deux transporteurs du fer. Il a été proposé que Dr2539 diffère des autres protéines de la famille DtxR, en agissant comme un régulateur positif et négatif, impliqué dans la régulation négative des gènes du transport du manganèse et dans la régulation positive des gènes du transport du Fer (Chen et al., 2010b).

En comparaison avec la souche sauvage, dans laquelle la concentration des ions Fe^{2+} est 3 fois plus élevée que celle des ions Mn^{2+} , la concentration des ions Fe^{2+} est seulement 2 fois plus élevée que celle des ions Mn^{2+} dans le mutant Δ dr2539 (Chen et al., 2010b), suggérant que Dr2539 joue un rôle important dans l'homéostasie du manganèse et du fer chez *D. radiodurans*.

L'étude de Sun et ses collaborateurs, a montré que Dr2539 peut être activée in vivo et in vitro par la présence des ions Mn^{2+} , ce qui lui permet de se fixer spécifiquement au promoteur du transporteur de manganèse *mntH* (dr1709) pour réprimer son expression (Sun et al., 2012).

Chez *D. radiodurans*, une protéine Fur a été identifiée, Dr0865. Le mutant Δ dr0865 est sensible aux rayonnements γ , UV et au traitement par le peroxyde d'hydrogène (Ul Hussain Shah et al., 2014). Par ailleurs, la délétion de dr0865 provoque de sévères défauts de croissance, qui sont encore plus prononcés, quand des ions Mn^{2+} sont ajoutés au milieu de culture. La comparaison de la concentration intracellulaire des ions Mn^{2+} montre que le mutant Δ dr0865 accumule une concentration d'ions Mn^{2+} 3 fois plus élevée que la souche sauvage, suggérant que le gène dr0865 limite l'import des ions Mn^{2+} ou augmente leur export de la cellule. Un changement significatif des concentrations intracellulaires des ions Fe^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} a également été constaté dans le mutant Δ dr0865 suggérant que Dr0865 n'est pas seulement impliquée dans la régulation de l'homéostasie des ions Mn^{2+} , mais influence aussi l'assimilation d'autres ions. Des analyses transcriptomiques (RNA seq) montrent qu'en présence de fortes concentrations de $MnCl_2$ (20 mM), 563 gènes sont dérégulés dans le mutant Δ dr0865, 60 % de ces gènes sont impliqués dans le transport et le métabolisme des ions inorganiques, ou des nucléotides ou des gènes impliqués dans la transcription de l'ADN (Ul Hussain Shah et al., 2014). Dr0865 est impliquée de manière directe ou indirecte, dans

l'induction de l'expression de *mntE* (*dr1236*) codant une pompe à efflux du manganèse et réprime l'expression de 3 gènes codant des transporteurs du manganèse (*dr2283*, *dr2284*, *dr2523*). Ces analyses ont également mis en évidence qu'en présence de forte concentration de $MnCl_2$ (20 mM), 12 gènes codant des protéines connues pour générer des ROS endogènes (cytochromes, flavoprotéines, des protéines à centre fer-soufre et des enzymes dépendantes du NADH ou NADPH...) sont réprimés dans le mutant $\Delta dr0865$ et le système toxine-antitoxine MazE-MazF est induit, suggérant que le mutant $\Delta dr0865$ réduirait la croissance cellulaire et la production de ROS endogènes pour compenser la sensibilité au manganèse (Ul Hussain Shah et al., 2014). Sun et al. (Sun et al., 2012) ont montré par des expériences de retard sur gel que *Dr0865* se fixe aux promoteurs des gènes codant des transporteurs du manganèse de type ABC (*dr2283*, *dr2284*, *dr2523*).

4°) **Le répresseur transcriptionnel DdrO et la métalloprotéase IrrE**

Récemment, le répresseur transcriptionnel DdrO, de la famille XRE (xenobiotic response element), a été identifié comme étant impliqué, en conditions standards, dans la répression de l'expression des gènes ayant en amont de leur séquence codante, un motif RDRM (radiation dessiccation response motif) qui correspond à une séquence palindromique de 17 pb (**Figure 32**) (Devigne et al., 2015; Ludanyi et al., 2014; Makarova et al., 2007; Wang et al., 2015; Bouthier de la Tour et al., 2017). L'ensemble des gènes ayant le motif RDRM est appelé le régulon RDR (radiation dessiccation response). L'existence de ce régulon est commune à plusieurs espèces de Deinococcaceae dont *D. geothermalis*, *D. deserti* (de Groot et al., 2009; Makarova et al., 2007).

Chez *D. radiodurans*, une vingtaine de gènes possède le motif RDRM en amont de leur séquence codante et il a été démontré qu'en l'absence de stress génotoxique, DdrO réprime l'expression de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (*recA*, *ssb*, *gyrA*, *uvrB*, *recQ* ...) et des gènes spécifiques aux Deinococcaceae (*ddrA*, *ddrB*, *ddrC*, *ddrO*, *pprA*,...) (**Figure 33**) (Bouthier de la Tour et al., 2017; Devigne et al., 2015; Ludanyi et al., 2014; Wang et al., 2015).

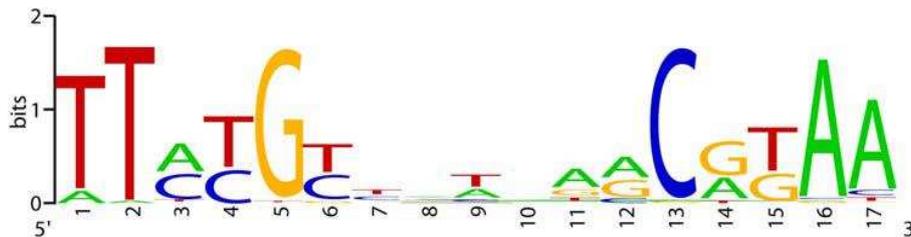


Figure 32: Séquence logo déterminée à partir des 24 gènes ayant le motif RDRM chez *D. radiodurans* (Makarova et al., 2007).

Le régulateur transcriptionnel DdrO, possède en N-terminal, un motif de fixation à l'ADN de type hélice-tour-hélice. Les expériences de retard sur gel et de ChiP-PCR confirment que DdrO se fixe aux 21 régions promotrices ayant le motif RDRM (*recA*, *ssb*, *gyrA*, *uvrB*, *recQ*, *ddrA*, *ddrB*, *ddrC*, *ddrO*, *pprA*...) et la délétion du motif RDRM des régions promotrices des gènes *recA*, *ddrO*, *ddrB*, *pprA*, *ddrA*, *ssb* et *recQ*, entraîne in vitro la perte de la fixation de DdrO (Wang et al., 2015). De plus, il a été démontré in vivo, que l'introduction de mutations dans le motif RDRM en amont de la séquence codante du gène *ddrB*, induit son expression de manière constitutive, démontrant également que le motif RDRM exerce un rôle clé dans la régulation de l'expression du gène *ddrB* (Devigne et al., 2015).

Il a par ailleurs été démontré que la protéine IrrE également appelée PprI (*dr0167*) joue un rôle crucial dans la régulation de la réparation des dommages de l'ADN et dans la protection des protéines contre l'oxydation (Earl et al., 2002a; Hua et al., 2003). En effet, le mutant de délétion Δ *irrE* est l'un des mutants les plus sensibles aux rayonnements γ , UV et au traitement des cellules à la mitomycine C. Les analyses transcriptomiques montrent qu'après exposition au rayonnement γ , le mutant Δ *irrE* présente une perte de l'induction de nombreux gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (*recA*, *pprA*, *gyrA*, *uvrB*, *ssb*, *ddrC* et *ddrD*) (Hua et al., 2003). Il a également été démontré que ce mutant présentait une réduction de l'activité des catalases A et B. La protéine IrrE est composée de trois domaines : un domaine Zinc peptidase, un domaine central de fixation à l'ADN et un domaine senseur de type GAF (cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and transcription factor FhlA) (Vujicic-Zagar et al., 2009).

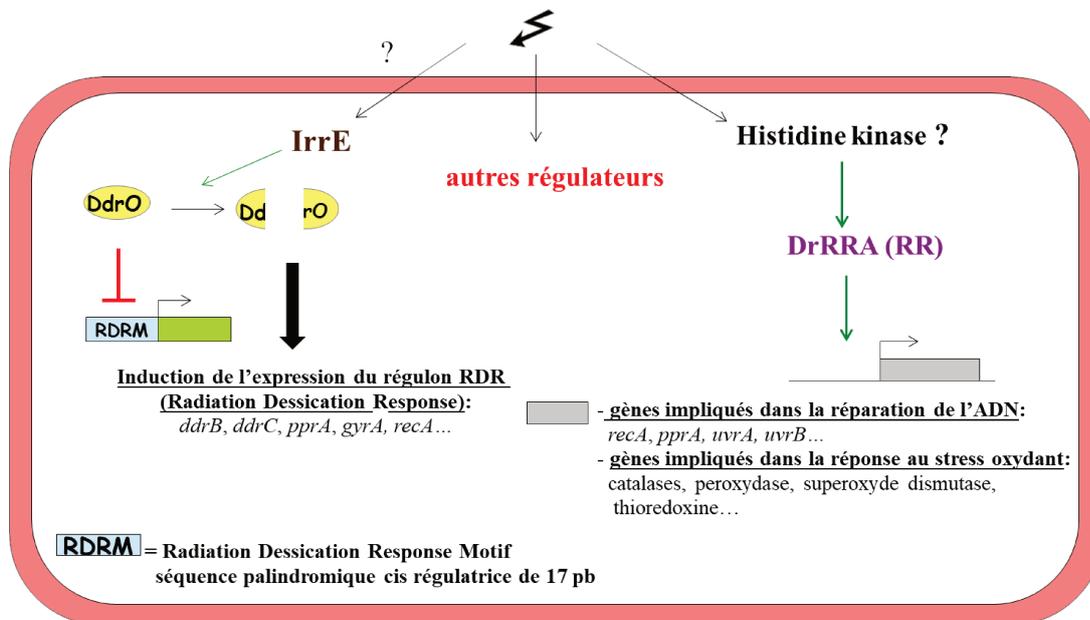


Figure 33: Description des principales voies régulatrices impliquées dans la radiorésistance chez *D. radiodurans*. Après exposition des cellules au rayonnement γ , IrrE, dont le mécanisme d'activation est inconnu, clive le répresseur DdrO (qui en absence de stress génotoxique, réprime les gènes ayant un motif RDRM en amont de leur séquence codante) et permet l'induction de l'expression des gènes *ddrB*, *pprA*, *gyrA*, *recA* etc (Devigne et al., 2015; Ludanyi et al., 2014). En parallèle, après exposition des cellules au rayonnement γ , le régulateur de réponse (RR) DrRRA, induit l'expression de *recA*, *pprA*, des enzymes antioxydantes (catalases, superoxyde dismutase...) (Wang et al., 2008).

Il a été démontré chez *D. deserti* et *D. radiodurans*, qu'après exposition des cellules au rayonnement γ , la métalloprotéase IrrE clive le répresseur DdrO entre la leucine 106 et l'arginine 107 pour *D. deserti* et la leucine 108 et l'arginine 109 pour *D. radiodurans* ce qui provoque son inactivation et la dérégulation des gènes du régulon RDR (**Figure 33**) (Ludanyi et al., 2014; Wang et al., 2015). Chez *D. radiodurans*, il a été démontré que la perte progressive de DdrO induit l'expression de 8 gènes du régulon RDR (*ddrA*, *ddrB*, *ddrC*, *ssB*, *recA*, *recQ*, *pprA*) (Bouthier de la Tour et al., 2017; Devigne et al., 2015; Wang et al., 2015). Une fois que tous les dommages engendrés par les rayonnements γ sont réparés, le clivage de DdrO par IrrE cesse, la concentration intracellulaire de DdrO augmente et les gènes appartenant au régulon RDR sont à nouveau réprimés (Devigne et al., 2015; Wang et al., 2015).

Chez *D. radiodurans*, il a également été proposé qu'en cas d'endommagement massif de l'ADN, empêchant la réparation rapide des lésions, l'induction prolongée des gènes contrôlés par DdrO engagerait les cellules vers une mort cellulaire de type apoptotique. En effet, il a été démontré que le gène *ddrO* est un gène essentiel et sa déplétion progressive provoque une

désorganisation du nucléoïde, une fragmentation de l'ADN et la formation de vésicules membranaires à l'extérieur de la cellule, qui sont les caractéristiques d'une cellule bactérienne en apoptose-like, suggérant ainsi que DdrO régule négativement les gènes impliqués dans le déclenchement de ce mécanisme d'apoptose-like (Devigne et al., 2015).

La protéine IrrE est exprimée de manière constitutive dans la cellule (Gao et al., 2006), le processus d'activation d'IrrE en réponse au rayonnement γ n'a pas encore été identifié, mais il a été montré chez *D. radiodurans*, in vitro que le clivage de DdrO par IrrE était dépendant de la présence des ions manganèse, suggérant que la variation de concentration des ions manganèse puisse activer la protéine IrrE en réponse au rayonnement γ (Wang et al., 2015). Chez *D. deserti* (Ludanyi et al., 2014), il a été proposé que l'activité métalloprotéase de IrrE soit régulée par la disponibilité dans la cellule, des ions zinc. In vitro, l'addition des ions zinc suffit à induire l'activité protéase de IrrE et le clivage de DdrO (Blanchard et al., 2017). Des analyses protéomiques (de Groot et al., 2009) ont montré que la protéine IrrE est faiblement exprimée et qu'en conditions standards, la plupart du zinc intracellulaire est lié aux protéines les plus fortement exprimées, ce qui limite la disponibilité du zinc pour IrrE. Il a été supposé que l'exposition des cellules au rayonnement γ ou à la dessiccation, induit un stress oxydant, ce qui résulte d'une libération rapide des ions zinc fixés par les cystéines des protéines cellulaires, ce qui augmente la disponibilité du zinc, qui peut se fixer et activer la métalloprotéase IrrE.

6°) IrrI (Dr0171)

Les analyses bioinformatiques montrent qu'IrrI possède un domaine de fixation à l'ADN de type HTH, et aucun homologue n'a été identifié dans les autres espèces bactériennes suggérant que c'est un régulateur transcriptionnel spécifique aux Deinococcaceae (Makarova et al., 2001). Des expériences de localisation par microscopie à épifluorescence montrent que la protéine IrrI-GFP est induite et recrutée au nucléoïde après exposition des cellules au rayonnement γ (6 kGy) (Lu et al., 2011). Le gène *irrI* est induit uniquement après exposition des cellules à des doses importantes de rayonnement γ (15 kGy) pour lesquelles les dommages cellulaires sont très nombreux (Liu et al., 2003; Tanaka et al., 2004). La délétion de *irrI* augmente la sensibilité de *D. radiodurans* aux agents génotoxiques (rayonnements γ , UV et au stress oxydant généré par le peroxyde d'hydrogène). En comparaison avec la souche sauvage, un retard dans la reconstitution du génome est constaté dans le mutant $\Delta irrI$, suggérant que la protéine IrrI soit impliquée dans la réponse au stress

chez *D. radiodurans* pour surmonter les effets létaux des agents génotoxiques (Lu et al., 2011; Udupa et al., 1994). Les analyses transcriptomiques montrent qu'en comparaison avec la souche sauvage, la délétion de *irrI* n'entraîne pas de changement significatif du profil transcriptomique en conditions standards, en revanche après exposition des cellules au rayonnement γ (6 kGy), l'expression de 153 gènes est significativement diminuée dans un mutant $\Delta irrI$ (Lu et al., 2011). Ces gènes sont impliqués dans le métabolisme et la réparation de l'ADN, la traduction, le métabolisme cellulaire, les modifications post-traductionnelles, la transduction du signal et 81 gènes codent pour des protéines de fonction inconnue (Lu et al., 2011).

7°) **Les facteurs sigma chez *D. radiodurans***

L'étude de l'ARN polymérase et des facteurs σ associés, responsables de la reconnaissance des promoteurs, montre que *D. radiodurans* possède un facteur sigma majeur σ^A qui possède une forte homologie avec le facteur σ^{70} de *E. coli*, et 3 facteurs σ alternatifs (codés par sig1: dr0180, sig2: dr0804 et dr2482). L'expression de sig1 et dr2482 augmente significativement après exposition des cellules au rayonnement γ (15 kGy) (Liu et al., 2003). Des études ont montré que les facteurs sigma Sig1 et Sig2 sont impliqués dans la réponse au choc thermique chez *D. radiodurans*.

B- Les systèmes à deux composants

Les bactéries sont capables de percevoir et de s'adapter à des changements environnementaux en utilisant les systèmes à deux composants. Ces systèmes de transduction de signal sont constitués de deux composants (**Figure 34**) : une protéine histidine kinase « senseur », ancrée dans la membrane et un régulateur de réponse. Le domaine senseur de l'histidine kinase est généralement localisé dans le milieu extracellulaire, mais peut également être situé dans la membrane ou dans le cytoplasme dans le cas où l'histidine kinase capte des perturbations membranaires ou des signaux intracellulaires. Les stimuli sont captés par le domaine N-terminal senseur de l'histidine kinase, qui provoque l'auto-phosphorylation d'un résidu histidine dans le domaine catalytique C-terminal. Puis le groupement phosphate est transféré au régulateur de réponse. Le régulateur de réponse contient deux domaines, un domaine receveur contenant un résidu aspartate qui reçoit le groupement phosphate et un domaine effecteur. Dans la majorité des régulateurs de réponse, le domaine effecteur est un domaine de fixation à l'ADN, mais il peut également s'agir d'un domaine de fixation à l'ARN, à un ligand ou à une protéine. Le transfert du groupement phosphate au régulateur de réponse, provoque un changement conformationnel de ce régulateur qui libère le domaine effecteur et permet au régulateur de réponse d'exercer son rôle de régulateur au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel ou post-traductionnel (Zschiedrich, Keidel & Szurmant, 2016).

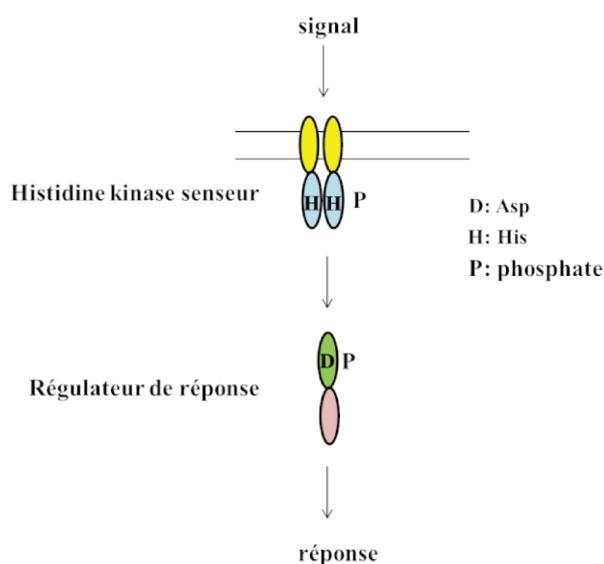


Figure 34: Principe du mécanisme d'action des systèmes à deux composants.

23 gènes codant des histidines kinases et 25 gènes codant des régulateurs de réponses putatifs ont été identifiés dans le génome de *D. radiodurans* (Makarova et al., 2001). Afin d'analyser l'implication des systèmes à deux composants dans la régulation de la réponse cellulaire chez *D. radiodurans* pour surmonter les effets létaux des agents génotoxiques, les simples mutants de 12 histidines kinases ont été construits et caractérisés : 5 de ces mutants (dr0860, dr1174, dr1556, dr2244 et dr2419) ont une diminution d'au moins un facteur 10 de la survie cellulaire après exposition des cellules au rayonnement γ , 3 de ces mutants (dr1174, dr1227, dr2244) sensibilisent *D. radiodurans* au rayonnement UV, 3 (dr0860, dr2416, dr2419) sont sensibles aux dommages engendrés par la mitomycine C et 2 (dr2416 et dr2419) sont sensibles au stress oxydant généré par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Im et al., 2012). Ces résultats suggèrent que les histidines kinases jouent un rôle important dans la réponse aux stress chez *D. radiodurans*.

Des études sur le rôle du régulateur de réponse DrRRA (dr2418) et le système à deux composants : RadS/RadR (drB0090/drB0091) ont été entreprises chez *D. radiodurans*.

1°) **Le régulateur de réponse DrRRA**

DrRRA joue un rôle important dans la radiorésistance chez *D. radiodurans*. Cette protéine est un régulateur de réponse, appartenant à la famille OmpR/PhoB (Liu et al., 2012). Il contient un domaine receveur bien conservé en N-terminal, avec l'acide aspartique hautement conservé en position 54, site prédit de phosphorylation, et un domaine effecteur de fixation à l'ADN en C-terminal, mis en évidence, par des expériences de retard sur gel, par la fixation spécifique de DrRRA au promoteur du gène *ddrI*, un régulateur transcriptionnel de la famille CRP/FNR (Wang et al., 2008). Des études cristallographiques de la protéine DrRRA suggèrent qu'après la phosphorylation du domaine receveur, un changement conformationnel de la protéine se produit, permettant la libération du domaine effecteur et la fixation de DrRRA aux promoteurs des gènes dont il contrôle l'expression (Liu et al., 2012).

Le mutant Δ drRRA est très sensible au rayonnement γ et au peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Il est également sensible au rayonnement UV et à la dessiccation (le mutant Δ drRRA est respectivement 50 fois, 5 fois et 10 fois plus sensible que la souche sauvage après exposition des cellules à une concentration de 25 mM de peroxyde d'hydrogène, 750 J/m² de rayonnement UV et après 50 jours d'incubation dans un dessiccateur avec un taux d'humidité inférieur à 5%) (Wang et al., 2008). A une dose de 2 kGy, le mutant Δ drRRA est 100 fois plus sensible que la souche sauvage et un retard de la cinétique de réparation de l'ADN est observé

(Wang et al., 2008). La comparaison du profil transcriptomique du mutant Δ drRRA et de la souche sauvage montre que de nombreux gènes sont dérégulés en l'absence de DrRRA en condition normale ou après exposition au rayonnement γ . En particulier, la délétion de drRRA entraîne une réduction de l'expression de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (recA, uvrA, uvrB, uvrC, uvrD...), de gènes spécifiques aux Deinococceaceae (pprA, ddrC, ddrN, ddrE, ddrP...) et de gènes impliqués dans la protection contre le stress oxydant tels que ceux codant les catalases: dr1998, drA0259 et drA0146, les superoxydes dismutases: dr1279 et dr1546, la peroxydase: drA0145, la thioredoxine: dr0944 et la ferritin/Dps-like: dr2263 (**Figure 33**) (Wang et al., 2008), mais rien ne prouve que ces gènes soient directement régulés par DrRRA.

L'histidine kinase senseur à l'origine de l'activation de DrRRA par phosphorylation n'a pas encore été identifiée. Le gène dr2419, codant une histidine kinase putative, est localisé juste en aval du gène drRRA (dr2418), formant un opéron potentiel incluant un 3^{ème} gène (dr2420) codant lui aussi pour un régulateur de réponse putatif. Cependant, le mutant Δ dr2419 est moins sensible que le mutant Δ drRRA au rayonnement γ , suggérant que le régulateur de réponse DrRRA pourrait être régulé par plusieurs histidines kinases (Wang et al., 2008).

2°) Le système à deux composants RadS/RadR

Un régulateur de réponse putatif codé par le mégaplasme MP1 (RadR: drB0091) a été identifié, parmi un pool de protéines fixant l'ADN, comme étant induit en réponse au rayonnement γ (Desai et al., 2011). RadR est localisé en amont de drB0090, codant pour une histidine kinase putative, RadS. Les simples mutants Δ radR et Δ radS sont très sensibles au rayonnements γ , UV et présentent un retard de la cinétique de réparation de l'ADN (pour une dose de 8 kGy, les mutants Δ radR et Δ radS sont 100 fois plus sensibles au rayonnement γ que la souche sauvage) (Desai et al., 2011; Im et al., 2012). Des expériences in vitro, ont mis en évidence, l'autophosphorylation de RadS et le transfert du phosphate au régulateur de réponse RadR. Cette étude suggère que le système à deux composants RadS/RadR joue un rôle important dans la réponse aux rayonnements γ et UV, cependant les cibles de RadR n'ont pas encore été identifiées (Desai et al., 2011).

C- Régulation post-transcriptionnelle

1°) Les petits ARN non codants

Les analyses transcriptomiques ont montré que chez *D. radiodurans*, l'exposition au rayonnement γ induit un changement important du profil d'expression des gènes. D'autres études transcriptomiques (Luan et al., 2014) ont montré que l'exposition de *D. radiodurans* au rayonnement γ n'engendre pas uniquement l'induction de l'expression d'ARNs messagers mais aussi celle d'ARNs non codants (ncRNAs), incluant des ARNs antisens et des ARN de transfert qui peuvent moduler la traduction des ARNm. Les ARN non codants (ncARNs), d'une taille de 21 à 400 nucléotides, sont des régulateurs post-transcriptionnels, jouant un rôle essentiel dans la réponse aux changements environnementaux (Dutta & Srivastava, 2018; Gottesman & Storz, 2011). L'exposition au rayonnement γ engendre environ 0.005 cassures double brin/ Gy/Mb d'ADN (Cox & Battista, 2005; Minton, 1994). Il a donc été proposé que, de par leur petite taille, les gènes exprimant des ncARNs soient plus épargnés des dommages liés au rayonnement γ . 199 ncARNs potentiels ont été identifiés dans le génome de *D. radiodurans*, dont 8 ont un changement d'expression après exposition des cellules au rayonnement γ (15kGy), ce qui suggère qu'ils pourraient jouer un rôle dans la réponse cellulaire mise en place chez *D. radiodurans* pour surmonter les effets létaux des agents génotoxiques (Tsai et al., 2015). Des études futures seront nécessaires pour déterminer leurs rôles et leurs cibles.

2°) PprM

PprM (pleiotropic protein promoting DNA repair M, dr0907) appartient à la famille Csp (cold shock protein). La protéine PprM possède 2 motifs de fixation aux ARNs et 4 sites de fixation à l'ADN (Li et al., 2017; White et al., 1999). *E. coli* possède 9 protéines de la famille Csp, impliquées dans l'adaptation aux températures basses, la croissance cellulaire et la phase stationnaire (Graumann & Marahiel, 1998; Trun & Johnston, 2003). Les protéines Csp sont des protéines chaperonnes des ARN, dont le rôle est de prévenir la formation de structures secondaires qui conduiraient à la terminaison prématurée de la transcription. L'absence de pprM sensibilise *D. radiodurans* au rayonnement γ , à la dessiccation et au peroxyde d'hydrogène (Zeng et al., 2017) suggérant l'implication de la protéine PprM dans la réponse au stress engendrée par des agents endommageant l'ADN. Des analyses par Western-immunoblot montrent qu'en conditions standards, dans le mutant Δ pprM, le niveau

d'expression de la protéine PprA est comparable à celui observé dans la souche sauvage après exposition au rayonnement γ , ce qui suggère que la protéine PprM est impliquée dans la répression de l'expression de PprA en conditions standards. Le double mutant Δ pprA Δ pprM est significativement plus radiosensible que les simples mutants Δ pprA ou Δ pprM, suggérant que PprM régule l'expression d'autres protéines importantes pour la radiorésistance (Ohba et al., 2009).

Comparé à la souche sauvage, le mutant Δ pprM accumule une concentration intracellulaire de ROS 2 fois plus importante en conditions standards et 4 fois plus importante après exposition des cellules à une dose de 2 kGy de rayonnement γ (Zeng et al., 2017) et l'activité catalase globale est diminuée de 40 % comparée à celle de la souche sauvage. Les analyses par RT-qPCR de Jeong et al. (Jeong et al., 2016), ont montré, que PprM est nécessaire à l'expression de la catalase katE (dr1998) en conditions standards. Il a par ailleurs été démontré que PprM réprime l'expression de dtxR et perR, codant 2 régulateurs négatifs de katE. Récemment, il a été démontré que le mutant Δ pprM, présente également une diminution de l'expression du gène dps (drB0092) et de 3 gènes (crtI: dr0861, crtB: dr0862, et crtO: dr0093) impliqués dans la biosynthèse de la deinoxanthine, un caroténoïde impliqué dans la résistance contre le stress oxydant chez *D. radiodurans* (Zeng et al., 2017). L'ensemble de ces données suggère que PprM joue un rôle dans la réponse au stress oxydant chez *D. radiodurans*.

Récemment, une autre étude a montré que la délétion des domaines de fixation à l'ARN de PprM cause des défauts de croissance en conditions standards, inhibe totalement la croissance cellulaire à 15°C (Li et al., 2017) et sensibilise *D. radiodurans* à l'exposition au rayonnement UV, à la mitomycine C et à H₂O₂. L'ensemble de ces données suggère que PprM, via ses domaines de fixation à l'ARN, joue un rôle important dans la réponse au stress chez *D. radiodurans*.

Enfin, des expériences de retard sur gel montrent que PprM est capable de se fixer à la région 5' UTR de son propre ARNm pprM, suggérant qu'il s'autorégule (Li et al., 2017).

D- L'implication des sérines thréonines kinases

La régulation de l'expression des gènes et de l'activité des protéines, suite à un stress génotoxique, implique également l'action des protéines kinases. En effet l'implication des sérines thréonines kinases dans la phosphorylation des protéines de réparation de l'ADN est couramment observée chez les eucaryotes. Chez *D. radiodurans*, il a également été constaté que le niveau de protéines phosphorylées augmentait significativement après exposition des cellules au rayonnement γ (Kamble et al., 2010). Les études de Rajpurohit et al. (Rajpurohit, Desai & Misra, 2013; Rajpurohit & Misra, 2013) ont montré que la délétion du gène *rqkA* (*dr2518*), codant pour une sérine thréonine kinase, augmente fortement la sensibilité de *D. radiodurans* au rayonnement γ et induit un changement du profil d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme, dans la réponse au stress, dans la transduction de signal ainsi que des gènes codant des protéines de fonction inconnue après exposition des cellules au rayonnement γ . Le gène *rqkA* est induit 15 fois après exposition des cellules au rayonnement γ (6 kGy) (Rajpurohit & Misra, 2010) suggérant que cette sérine thréonine kinase joue également un rôle important dans la réponse au stress chez *D. radiodurans*. Les sérines thréonine kinases phosphorylent les protéines ayant dans leur séquence protéique, le motif de phosphorylation suivant X-X-S/T-G-X ou $X\alpha\alpha\alpha TX(X/V)\$(P/R)I$ dans lequel T est le site phospho-accepteur, \$ un résidu hydrophobe, α un résidu acide et X n'importe quel acide aminé. Des analyses bioinformatiques ont permis de mettre en évidence la présence de ces motifs dans plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN (HU, LexA, PprA, RecF, RecR, UvrA, UvrC, ParB1...) (Rajpurohit & Misra, 2013). Il a par ailleurs été démontré que RqkA était capable de phosphoryler PprA et que la phosphorylation de PprA augmentait, *in vitro*, sa capacité de fixation à l'ADN et son activité de stimulation de l'activité de l'ADN ligase (Rajpurohit & Misra, 2013). Il a également été montré que la sérine thréonine kinase RqkA phosphoryle les résidus tyrosine 77 et thréonine 318 de la protéine RecA, ce qui améliore son affinité pour l'ADN double brin et stimule son activité d'échange de brins (Rajpurohit et al., 2016). Ces données suggèrent que la sérine thréonine kinase RqkA pourrait jouer un rôle important dans la réponse au stress génotoxique chez *D. radiodurans*.

Chapitre 1:

**DdrI, un régulateur transcriptionnel de la famille
CRP/FNR, joue un rôle majeur dans l'adaptation au
stress chez D. radiodurans.**

PROBLEMATIQUE:

Un des enjeux actuels est de décrypter l'ensemble des réseaux de régulation impliqués dans les réponses cellulaires mises en place chez *D. radiodurans* pour surmonter les effets létaux des agents génotoxiques et/ou oxydants. Malgré les nombreuses études antérieures publiées, l'ensemble des acteurs contribuant à la radiorésistance de *D. radiodurans* n'a pas encore été identifié. Afin d'identifier de nouveaux acteurs impliqués dans la radiorésistance de *D. radiodurans*, une banque de mutants a été créée par mutagenèse par transposition et criblée pour la sensibilité aux rayonnements γ , UV et au traitement des cellules à la mitomycine C ou au peroxyde d'hydrogène. L'un des mutants les plus sensibles aux différents agents génotoxiques et/ou oxydant contient une insertion de transposon dans le gène *ddrI* (*dr0997*) codant un facteur de transcription putatif (Dulermo et al., 2015). Après exposition à une dose de 10 kGy de rayonnement γ , le mutant d'insertion *ddrI::tn5* présente une survie cellulaire de 4,7 % comparée à 85 % pour la souche sauvage. Ces données suggèrent que *DdrI* est un acteur majeur de la réponse au stress génotoxique et/ou oxydant chez *D. radiodurans* (Dulermo et al., 2015).

Le gène *ddrI* (pour DNA damage response gene I, *dr0997*) a été initialement identifié parmi les gènes de *D. radiodurans* induits après exposition des cellules au rayonnement γ (induction d'un facteur 4 suite à une exposition à une dose de 3 kGy de rayonnement γ) (Tanaka et al., 2004).

Les analyses bioinformatiques montrent que le gène *ddrI* code un régulateur transcriptionnel de la superfamille CRP/FNR. En effet, la protéine *DdrI*, composée de 203 acides aminés, possède les caractéristiques des protéines appartenant à la sous famille CRP (cAMP receptor protein), à savoir, un domaine effecteur de fixation à l'AMPc en N-terminal et un domaine de fixation à l'ADN (motif hélice-tour-hélice) en C-terminal.

Parmi les protéines de la sous-famille CRP, le régulateur global CRP^{Ec} de *E. coli*, régule l'expression de gènes impliqués dans l'utilisation des sources de carbone en l'absence de glucose et se fixe à la séquence d'ADN: TGTGAN6TCACA présente dans les régions promotrices de ses gènes cibles. Les protéines de la sous-famille CRP ont la particularité de se fixer à des séquences d'ADN qui sont conservées même au sein d'espèces bactériennes éloignées phylogénétiquement.

L'un des premiers objectifs de ma thèse a été de caractériser le rôle biologique de *DdrI* dans la réponse au stress, en construisant le mutant de délétion Δ *ddrI* et en réalisant des tests

de sensibilité aux agents génotoxiques (rayonnement UV, mitomycine C) et au stress oxydant généré par le paraquat.

Huit mois après le début de ma thèse, une équipe concurrente a publié une étude (Yang et al., 2016) sur 4 homologues de la sous-famille CRP chez *D. radiodurans*, à savoir (DdrI, Dr2362, Dr0834, Dr1646). En particulier, ils ont démontré que la délétion du gène *ddrI* engendrait de sévères défauts de croissance en conditions standards et sensibilisait fortement *D. radiodurans* à l'exposition aux rayonnements γ , UV et au traitement des cellules à la mitomycine C ou au peroxyde d'hydrogène. En revanche, la délétion de *dr2362*, *dr0834* ou *dr1646* n'engendre qu'une légère, voir aucune diminution, de la survie cellulaire après exposition des cellules à ces différents stress.

D'autre part, Yang et ses collaborateurs ont identifié, sans indiquer la méthode utilisée, un site cible de DdrI, proche de la boîte CRP^{Ec}, dans la région promotrice de 18 gènes impliqués dans le contrôle qualité des protéines (*lon1*, *lon2*), la réponse au stress oxydant (*terB* codant la tellurite resistance protein), *dr1506* codant la NADH oxydoréductase, la réparation de l'ADN (*uvrE*, *pprA*, *recN*) ou encore le métabolisme de l'AMPc (*cpdB* codant une enzyme qui catalyse la conversion de l'AMPc en AMP) etc. Par des expériences de retard sur gel, ils ont aussi montré que la protéine DdrI se fixait à la région promotrice de ces gènes ainsi qu'à celle de son propre promoteur. Par ailleurs, ils ont montré par des expériences de RT-qPCR qu'en conditions standards et/ou après exposition des cellules au rayonnement γ ou à H₂O₂, DdrI, régule l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant (incluant *katE* (*dr1998* et *dra0259*), *katA* (*dra0146*), *sodC* (*dra0202*), une NADH oxydoréductase (*dr1506*)), la réparation de l'ADN (*recA*, *recN*, *recG*, *recF*, *recO*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrE*, *pprA*, *priA*, *ddrB*, *ddrC* et *ddrD*), le contrôle qualité des protéines (*lon1*, *lon2*), le métabolisme de l'AMPc (*cpdB* et *dra0006*) et de 2 gènes codant des régulateurs transcriptionnels (*ddrO* et *drRRA*). L'ensemble de ces données suggère que DdrI est un régulateur global, qui contribue à l'extrême radiorésistance de *D. radiodurans* en régulant de nombreuses voies cellulaires.

La publication de cette étude nous a obligé à modifier la ligne directrice de mon projet de thèse, pour cela nous avons montré par des expériences de complémentation hétérologue et des expériences de retard sur gel que DdrI et la CRP^{Ec} reconnaissent des séquences d'ADN proches, ce qui nous a permis de réaliser des prédictions *in silico* des sites cibles potentiels de DdrI dans l'ensemble du génome de *D. radiodurans*.

Le gène *ddrI* est le seul régulateur transcriptionnel identifié parmi les 25 gènes les plus induits chez *D. radiodurans* après traitement des cellules à un choc thermique de 5 min à 48°C (Schmid et al., 2005a), suggérant que DdrI pourrait également jouer un rôle crucial dans la

réponse au choc thermique chez *D. radiodurans*. Nous avons donc analysé in vivo par des expériences de RT-qPCR, l'implication de DdrI dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réponse au choc thermique chez *D. radiodurans*.

Par ailleurs, le mutant Δ ddrI présente de sévères défauts de croissance en conditions standards de croissance et nous avons montré que la protéine DdrI est fortement induite en phase stationnaire de croissance. Nous avons donc analysé le rôle de DdrI dans la division cellulaire et/ou la ségrégation du génome, en effectuant des observations de la morphologie des cellules en fonction de la phase de croissance, par microscopie à épifluorescence.

1°) Les régulateurs transcriptionnels de la famille CRP/FNR

A- Caractéristiques générales des protéines de la famille CRP/FNR

Les bactéries peuvent être exposées dans la nature, à des stress très variés, incluant, l'anoxie, le stress osmotique ou oxydant, des variations de pH ou de température, des changements de la disponibilité des nutriments, la présence d'antibiotiques ou de métaux lourds etc, les obligeant à s'adapter rapidement afin de survivre à ces changements environnementaux. Les régulateurs transcriptionnels de la famille CRP/FNR (cAMP receptor protein/fumarate and nitrate reductase) sont capables de détecter et de répondre à un large spectre de signaux intracellulaires ou extracellulaires tels que l'AMP cyclique (adénosine monophosphate cyclique), l'anoxie, le monoxyde de carbone, le stress oxydant ou nitrosatif, le monoxyde d'azote, le 2-oxoglutarate ou la température etc.(Korner, Sofia & Zumft, 2003).

Cette famille de régulateurs transcriptionnels a été définie en 1983, suite à l'identification chez *E. coli*, de deux facteurs de transcription présentant des similarités structurales: la protéine CRP (ou CAP pour catabolite activator protein), impliquée dans l'utilisation des sources de carbone en l'absence de glucose (Shimada et al., 2011; Stulke & Hillen, 1999) et le régulateur FNR (Fumarate and nitrate reductase regulator), qui en l'absence d'oxygène, induit l'expression des gènes impliqués dans la respiration anaérobie (Shaw, Rice & Guest, 1983).

Les protéines de la famille CRP/FNR sont très largement distribuées au sein des espèces bactériennes. En effet, il a été reporté en 2003 que 80% des génomes séquencés possèdent au moins une protéine de cette famille. Cependant, ces protéines ne sont pas universelles, étant donné qu'aucun gène codant une protéine de cette famille n'a été identifié par exemple, dans le génome des bactéries *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydomonas pneumoniae*, *Helicobacter pylori* (Korner et al., 2003).

Les régulateurs de la famille CRP/FNR sont impliqués dans le contrôle de mécanismes très variés, tels que le catabolisme de diverses sources de carbone ou d'azote, la respiration anaérobie, la dénitrification, la virulence, la réponse au stress oxydant etc ((Korner et al., 2003), **Tableau 2**).

En 2003, 369 protéines de la famille CRP/FNR ont été répertoriées et des études phylogénétiques ont permis de les classer en 14 sous-familles : ArcR, CoxA, CprK, Crp, Dnr, FixK, Flp, Fnr, FnrN, MalR, NnrR, NtcA, PrfA et YeiL (Korner et al., 2003). Une brève

description du rôle, du signal perçu ainsi que la séquence d'ADN consensus reconnue par le régulateur transcriptionnel est indiquée dans le **Tableau 2** pour un membre de chaque sous-famille de la famille CRP/FNR.

Les protéines CRP/FNR ont une taille d'environ 230-250 acides aminés et sont caractérisées par la présence de 2 domaines. Un large domaine senseur en N-terminal (d'environ 170 acides aminés), similaire au domaine de fixation à l'AMP cyclique et un domaine de fixation à l'ADN en C-terminal (70-75 acides aminés), de type wHTH (winged helix-turn-helix), constitué d'hélices α et de feuillets β selon la topologie : $\alpha 1-\beta 1-\beta 2-\alpha 2-\alpha 3-\beta 3-\beta 4$ (<https://prosite.expasy.org/doc/PS00042>), permettant au régulateur de se fixer aux régions promotrices de ses gènes cibles et d'exercer ainsi son rôle d'activateur ou de répresseur transcriptionnel. Ces 2 domaines sont connectés par une région charnière, impliquée dans la transmission du signal entre le domaine senseur N-terminal et le domaine de fixation à l'ADN C-terminal (Korner et al., 2003). Les régulateurs transcriptionnels de la famille CRP/FNR sont généralement des activateurs de la transcription, bien que dans quelques cas, ils agissent également comme des répresseurs transcriptionnels (Botsford & Harman, 1992).

Bactéries	Sous-famille CRP/ FNR	Nom du régulateur	Fonction du régulateur	Signal activateur ou inhibiteur du régulateur	Séquence d'ADN consensus reconnue par le régulateur transcriptionnel	Références
Bacillus licheniformis	ArcR	ArcR	catabolisme anaérobie de l'arginine	non déterminé	non déterminée	(Maghnoouj et al., 2000)
Rhodospirillum rubrum	CooA	CooA	utilisation du monoxyde de carbone comme source d'énergie	monoxyde de carbone	non déterminée	(Aono et al., 1996; He et al., 1996; Shelver et al., 1997)
Desulfotobacterium dehalogenans	CprK	CprK	Halorespiration (utilisation de composés halogénés comme accepteur final des électrons dans la respiration anaérobie)	3-chloro-4-hydroxyphény lacétate	TTAATN4ACTAA	(Smidt et al., 2000)
E. coli	Crp	Crp ^{Ec}	catabolisme des sources de carbone en l'absence de glucose	AMP cyclique	TGTGAN6TCACA	(Shimada et al., 2011; Stulke & Hillen, 1999)
Paracoccus denitrificans	DnR	Nnr ²	dénitrification	monoxyde d'azote	TTGACN4ATCAA	(Hutchings & Spiro, 2000; Van Spanning et al., 1995)
rhizobia	FixK	FixK ²	diazotrophie (fixation de l'azote gazeux N ₂)	non déterminé	TTGAN6TCAA	(Batut et al., 1989; Fischer, 1994)
Lactococcus lactis ssp. cremoris	Flp	FlpA ¹	réponse au stress oxydant, homéostasie du zinc	oxygène	non déterminée	(Gostick et al., 1999; Scott, Guest & Green, 2000)
E. coli	Fnr	Fnr ¹	respiration anaérobie	oxygène	TTGATN4ATCAA	(Kiley & Beinert, 1998; Spiro, 1994)
Rhodobacter sphaeroides	FnrN	FnrL ¹	photosynthèse, respiration anaérobie, métabolisme de l'azote, homéostasie du fer	oxygène	TTGAN4GATCA	(Imam, Noguera & Donohue, 2014; Oh, Eraso & Kaplan, 2000)
Bacteroides thetaiotaomicron	MalR	MalR	utilisation des polysaccharides présents dans l'intestin humain	non déterminé	non déterminée	(Cho et al., 2001)
Rhodobacter sphaeroides	NnrR	NnrR	dénitrification, métabolisme du monoxyde de carbone	monoxyde d'azote	(T/A)N2TTG(C/T)GN3(C/G)C(G/A)CAAN2 (A/T)	(Kwiatkowski & Shapleigh, 1996; Tosques, Shi & Shapleigh, 1996); Hartsock et al., 2010)
cyanobactéries	NtcA	NtcA	assimilation de l'azote, morphogénèse des cellules végétatives en hétérocystes	2-oxoglutarate	GTAN8TAC	(Herrero, Muro-Pastor & Flores, 2001; Luque, Flores & Herrero, 1994)
Listeria monocytogènes	PrfA	PrfA	virulence	température	TTAACAN2TGTTAA	(Johansson et al., 2002; Mengaud et al., 1991; Sheehan et al., 1996)
E. coli	YeiL	YeiL ¹	implication dans la phase stationnaire de croissance	non déterminé	non déterminée	(Anjum, Green & Guest, 2000)

Tableau 2 : Tableau descriptif de la fonction, du signal détecté et de la séquence d'ADN reconnue par un régulateur transcriptionnel de chaque sous-famille de la famille CRP/FNR. ¹ et ² correspondent aux régulateurs transcriptionnels qui utilisent respectivement leur centre Fer-Soufre et un cofacteur hème pour détecter les signaux environnementaux.

Différents mécanismes d'activation/inactivation des protéines de la famille CRP/FNR ont été décrits (Korner et al., 2003).

- Tout d'abord, l'interaction directe du régulateur avec une molécule effectrice induit l'activation du domaine de fixation à l'ADN (c'est le cas par exemple de l'AMPC pour les protéines de la sous-famille CRP et du 2-oxoglutarate pour les protéines de la sous-famille NtcA).

- Le second mode d'activation/inactivation dépend de la présence, au sein du régulateur, d'un groupement prosthétique (hème, pour les protéines FixK et Nnr) ou d'un centre Fer-Soufre (pour les protéines FlpA, Fnr, FnrN, et YeiL) (**Tableau 2**) qui interagit directement avec l'oxygène, le monoxyde d'azote ou le monoxyde de carbone. Par exemple, chez *E. coli*, il a été démontré que le centre Fer-Soufre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ de la protéine Fnr joue un rôle central dans la détection de l'oxygène (Becker et al., 1996). En absence d'oxygène, la protéine Fnr possède un centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ (**Figure 35**) qui favorise la dimérisation de la protéine ainsi que sa fixation spécifique à l'ADN, ce qui conduit d'une part à l'induction de l'expression des gènes requis pour générer de l'énergie via la respiration anaérobie (nitrate réductase, fumarate réductase, formate déhydrogénase, glycérol 3 phosphate déhydrogénase...) et d'autre part la répression de l'expression des gènes codant des enzymes impliqués dans la respiration aérobie (cytochrome c oxydase, NADH déhydrogénase II...) (Jordan et al., 1997; Kiley & Reznikoff, 1991; Lazazzera et al., 1996; Sharrocks, Green & Guest, 1991; Spiro & Guest, 1990). En présence d'oxygène, le centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ est rapidement converti en $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$, ce qui conduit à la perte de la dimérisation de la protéine et donc à son inactivation. Les centres $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ sont ensuite dégradés générant des monomères Fnr dépourvus de centre Fer-Soufre (Mettert & Kiley, 2017).

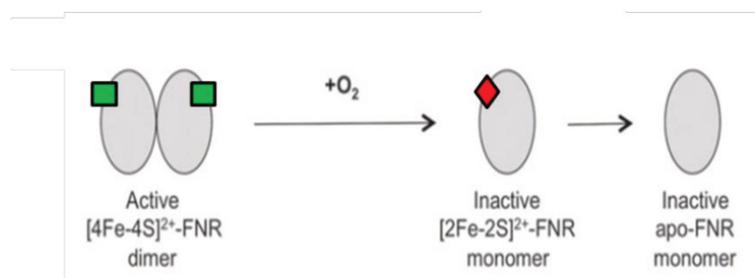


Figure 35 : Modèle de la régulation de l'activité de la protéine Fnr de *E. coli* par l'oxygène. Chaque monomère de la protéine Fnr est visualisé en gris, les centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ et $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ sont indiqués respectivement par des cubes verts et rouge (adapté de (Mettert & Kiley, 2017)).

- Le dernier mécanisme décrit, est l'interaction directe de la protéine CRP/FNR avec la molécule signal, induisant la transformation du régulateur par modification de la structure de la protéine vers un état actif. Par exemple, chez *Lactobacillus casei* (**Figure 36**), il a été démontré que contrairement à la protéine Fnr chez *E. coli*, la forme inactive et active de la protéine Flp reste sous forme dimérique, en revanche, son activité de régulateur transcriptionnel est médiée par un changement conformationnel engendré par la formation d'un pont disulfure intracaténaire en réponse à un stress oxydant ou en présence d'oxygène. Seule la forme oxydée de la protéine Flp est capable de fixer spécifiquement l'ADN (Gostick et al., 1998).

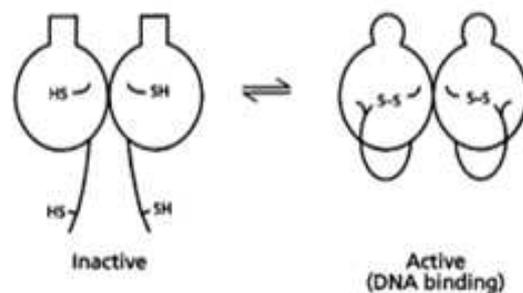


Figure 36 : Modèle de la régulation de l'activité de la protéine Flp de *Lactobacillus casei* par l'oxygène ou le stress oxydant. La protéine Flp est représentée sous forme dimérique (D'après (Gostick et al., 1998)).

B- Les protéines de la sous-famille CRP

1°) La CRP^{Ec} de E. coli

a- Structure de la protéine CRP^{Ec}

La CRP^{Ec} est un des 7 régulateurs globaux (CRP, FNR, IHF, FIS, ArcA, NarL et Lrp) (Martinez-Antonio & Collado-Vides, 2003) décrits chez E. coli et un des régulateurs transcriptionnels les mieux étudiés chez les bactéries (Gosset et al., 2004; Kolb et al., 1993). La CRP^{Ec} a d'ailleurs été le premier régulateur transcriptionnel dont la structure tridimensionnelle a été déterminée (McKay & Steitz, 1981). La CRP^{Ec} est une protéine homodimérique de 47 kDa. Chaque monomère est constitué d'un domaine N-terminal de fixation à l'AMP cyclique et d'un domaine C-terminal de fixation à l'ADN de type wHTH (**Figure 37**). Ces 2 domaines sont connectés par une courte région charnière, située entre les hélices C (domaine N-terminal) et D (domaine C-terminal) et impliquée dans la transmission du signal entre les deux domaines (Yu & Lee, 2004). Le domaine N-terminal est également impliqué dans la dimérisation de la protéine (Geng & Jiang, 2015).

Chaque monomère peut fixer séquentiellement 2 molécules d'AMPc avec une coopérativité négative (Takahashi, Blazy & Baudras, 1980). Des études cristallographiques ont montré que la protéine CRP^{Ec} peut exister sous 3 conformations différentes : 1) la forme inactive apo-CRP^{Ec} et selon la concentration d'AMPc 2) la forme complexée à une molécule d'AMPc: CRP^{Ec}-AMPc1 (high affinity cAMP site: **Figure 37**) ou à 3) la forme complexée à deux molécules d'AMPc: CRP^{Ec}-AMPc2 (high and low affinity cAMP sites: **Figure 37**) (Harman, 2001).

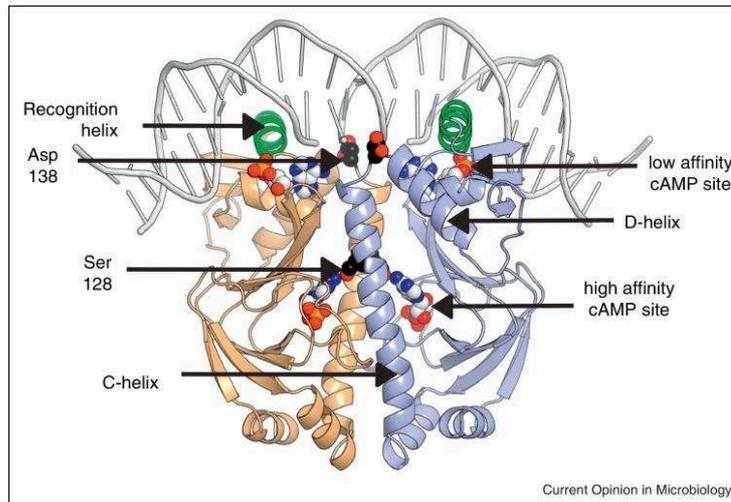


Figure 37: Représentation de la structure tridimensionnelle de la protéine dimérique CRP^{Ec} de *E. coli* en complexe avec l'AMPc. Chaque monomère est représenté par deux couleurs différentes (marron et bleu), les hélices αF impliquées dans la reconnaissance spécifique de l'ADN sont représentées en vert. La double hélice de l'ADN est visualisée en gris clair. La localisation de l'hélice C, à l'interface du dimère, et l'hélice D du domaine de fixation à l'ADN est indiquée. L'AMPc est visualisé en rouge et bleu (d'après (Green et al., 2014)).

La forme inactive apo-CRP^{Ec} fixe l'ADN de manière non spécifique avec une faible affinité, les hélices αF impliquées dans la reconnaissance de l'ADN étant enfouies à l'intérieur de la structure protéique. La fixation de l'AMPc au domaine N-terminal de la CRP^{Ec} induit un changement conformationnel de la protéine, ce qui provoque la libération des hélices αF ((Popovych et al., 2009; Sharma et al., 2009), **Figure 38**) et la fixation spécifique de la CRP^{Ec} à l'ADN. Il a par ailleurs été démontré que la forme complexée CRP^{Ec}-AMPc1 a presque la même affinité pour l'ADN spécifique que la forme complexée CRP^{Ec}-AMPc2, démontrant que l'activation de la CRP^{Ec}, via son réarrangement conformationnel, est induit dès la fixation de la première molécule d'AMPc (high affinity cAMP site: **Figure 37**, (Takahashi et al., 1989)).

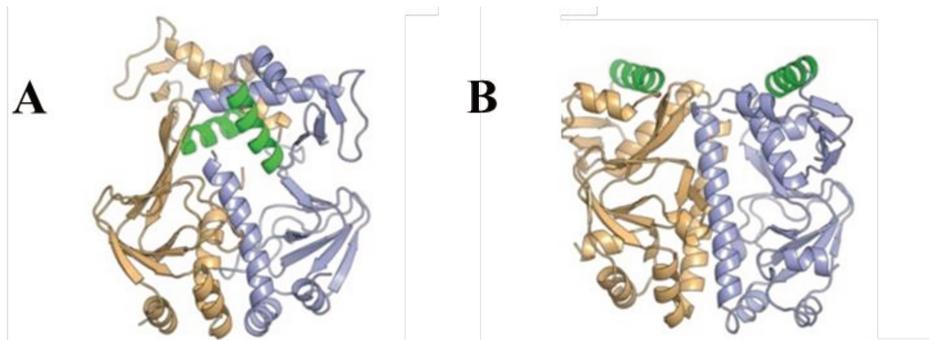


Figure 38: Représentation de la structure tridimensionnelle de la protéine CRP^{Ec} en absence (A) ou présence (B) d'AMPc. Chaque monomère est représenté par deux couleurs différentes (marron et bleu), les hélices αF impliquées dans la reconnaissance spécifique de l'ADN sont représentées en vert (d'après (Green et al., 2014)).

Le domaine N-terminal de la CRP^{Ec}, principalement formé de feuillets β , contient le site de fixation de l'AMPc, qui forme une cavité constituée de 15 acides aminés du monomère 1 (I30, V49, L61, S62, L64, I70, G71, E72, L73, R82, S83, A84, V86, R123 T127) et des acides aminés L124 et S128 du 2^{ème} monomère (Harman, 2001). La thréonine T127 joue un rôle crucial dans la stabilisation de la structure de l'apo-CRP^{Ec} et son activation allostérique (Li & Lee, 2011). En effet, il a été démontré que la thréonine T127 du monomère 1 et la sérine S128 du monomère 2 interagissent avec l'hétérocycle de l'adénine de l'AMPc, ce qui conduit à l'extension de l'hélice C du domaine N-terminal ((Tomlinson, Tutar & Harman, 2006); **Figure 38**). L'allongement de l'hélice C induit une délocalisation de la région charnière et un raccourcissement de l'hélice D du domaine de fixation à l'ADN, dont la structure en superhélice est simultanément déstabilisée, ce qui permet la libération des hélices αF impliquées dans la reconnaissance spécifique de l'ADN (Sharma et al., 2009). L'arginine R82 et l'acide glutamique E72 du monomère 1 sont essentiels à la fixation de l'AMPc (Gronenborn et al., 1988; Moore et al., 1992) et la sérine S83 et l'arginine R123 sont importantes pour l'activation de la CRP^{Ec} suite à la fixation de l'AMPc (Moore et al., 1992).

b- Rôle de régulateur transcriptionnel de la protéine CRP^{Ec}

La protéine CRP^{Ec} contrôle directement la régulation de l'expression d'au moins 378 gènes, incluant des gènes impliqués dans le transport et le catabolisme des sources de carbone, la glycolyse, le cycle de Krebs, la respiration aérobie et contrôle également la régulation de l'expression de 70 facteurs de transcription, démontrant que la protéine CRP^{Ec} est un régulateur global de l'expression génique chez E. coli, qui régule également indirectement de nombreux autres gènes (Haverkorn van Rijsewijk et al., 2011; Shimada et

al., 2011; Zheng et al., 2004). Il a également été mis en évidence que la CRP^{Ec} régule de manière directe la transcription du gène *rpoH* codant le facteur sigma σ^{32} , impliqué dans la réponse au choc thermique chez *E. coli* (Nagai et al., 1990) et de manière indirecte l'expression de plusieurs gènes de réponse au stress incluant des gènes codant des protéines chaperonnes (DnaK/DnaJ, GrpE, GroEL/GroES, MopAB), des protéases dépendantes de l'ATP ou des complexes protéases (ClpPX, HflB, HslUV, HtpX et Lon) et des petites protéines impliquées dans la réponse au choc thermique (HslS, HslT, HtpG) (Gosset et al., 2004).

La CRP^{Ec} se fixe aux régions promotrices des gènes ayant la séquence palindromique TGTGAn6TCACA en amont de leur séquence codante (Lawson et al., 2004) où chaque monomère interagit avec la moitié de la séquence palindromique (**Figure 39**).

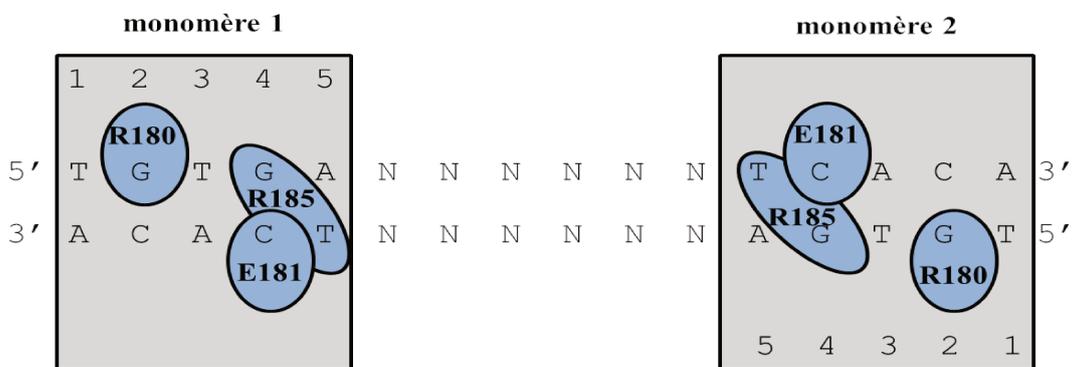


Figure 39: Interactions entre la CRP^{Ec} et sa séquence cible consensus. Les rectangles gris indiquent la position de chaque monomère de la protéine CRP^{Ec}. Les ronds et les ovales bleus indiquent les interactions entre les acides aminés de la protéine CRP^{Ec} et les différentes bases de l'ADN. Les bases de l'ADN de la moitié du palindrome sont numérotées de 1 à 5 (adapté de (Lawson et al., 2004)).

Chaque monomère de la CRP^{Ec} établit des contacts directs avec les bases en position 2, 4 et 5 de son site cible (**Figure 39**).

La fixation de la CRP^{Ec} à l'ADN induit une courbure de 87° de l'ADN (Busby & Ebright, 1999; Parkinson et al., 1996). Selon la position du site cible et le mécanisme d'activation de la transcription, les promoteurs qui sont activés par la CRP^{Ec} sont classés selon 3 catégories:

1) Les promoteurs de classe I (cas du promoteur *lac*), possèdent un site de fixation de la CRP^{Ec}, situé en amont des sites de fixation de l'ARN polymérase, centré ou proche de la position -61,5 par rapport au site d'initiation de la transcription +1, ou à une position distante d'un multiple de 10,5 pb en amont de la position -61.5 (**Figure 40**). L'activation transcriptionnelle du gène en aval implique l'interaction entre la CRP^{Ec} (via la région

d'activation AR1 (acides aminés 156 à 164) (Rhodius & Busby, 2000)) et le domaine carboxy-terminal de la sous-unité α (α -CTD) de l'ARN polymérase, ce qui favorise la fixation de l'ARN polymérase au promoteur et l'initiation de la transcription (Busby & Ebright, 1999).

2) Les promoteurs de classe II (incluant le promoteur galP1), possèdent un site de fixation de la CRP^{Ec} centré ou proche de la position -41.5 par rapport au site d'initiation de la transcription +1. 3 types d'interactions entre l'ARN polymérase et la CRP^{Ec} ont été répertoriés (**Figure 40**): l'interaction entre la région d'activation AR1 de la CRP^{Ec} et le domaine carboxy-terminal de la sous-unité α (α -CTD) de l'ARN polymérase, la région d'activation 2 de la CRP^{Ec} (AR2, constituée des acides aminés chargés positivement His19, His21 et Lys101 (Rhodius & Busby, 2000)) avec le domaine N-terminal de la sous-unité α (α -NTD) de l'ARN polymérase et la région d'activation 3 (AR3, constituée des acides aminés 53, 54, 55 and 58 (Rhodius & Busby, 2000)) de la CRP^{Ec} avec le facteur sigma σ^{70} (Lawson et al., 2004).

3) Les promoteurs de classe III (cas du promoteur acsP2) sont activés par la CRP^{Ec} via un mécanisme synergique impliquant 2 sites de fixation de la CRP^{Ec}: CRPI et CRPII, dont la fixation simultanée est nécessaire à l'expression optimale des gènes cibles (Beatty et al., 2003).

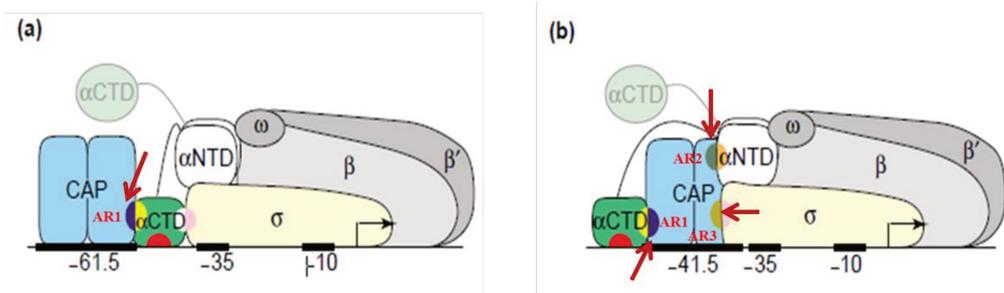


Figure 40: Représentations schématiques des complexes formés par la CRP^{Ec}, l'ARN polymérase et les promoteurs de classe I (a) et II (b). La structure dimérique de la CRP^{Ec} (CAP) est représentée par des rectangles bleus. L'ARN polymérase et ces différentes sous-unités sont représentées en vert et avec différents tons de gris. Les régions d'activation 1 (AR1), 2 (AR2) et 3 (AR3) (notées en rouge) présentes dans la protéine CRP^{Ec} sont respectivement visualisées en violet, vert olive et orange et par des flèches rouges (adapté de (Lawson et al., 2004)).

La CRP^{Ec} est un régulateur transcriptionnel positif et négatif, qui selon la position de son site cible, est également capable de réprimer l'expression de ses gènes cibles (exemple de aaeR, IdtB, ybiT, yccZ), ces gènes sont classés selon 2 catégories:

1) Les promoteurs de classe R1, possèdent un site cible de la CRP^{Ec} localisé dans une région comprise entre les positions (-49,5 et -10) ou entre les positions (+2 et +70,5) par rapport au site d'initiation de la transcription +1 (**Figure 41**). Lorsque la CRP^{Ec} se fixe à l'une de ces régions, elle bloque la fixation ou la progression de l'ARN polymérase. Cette classe de promoteur est également caractérisée par l'absence du motif TTAC dans le site de fixation de la CRP^{Ec}.

2) Dans le cas des promoteurs de classe R2 (**Figure 41**), le site de fixation de la CRP^{Ec} est dépourvu des motifs TTAC et GAGC et est localisé dans une région comprise entre la position -31 et -23 par rapport au site d'initiation de la transcription +1.

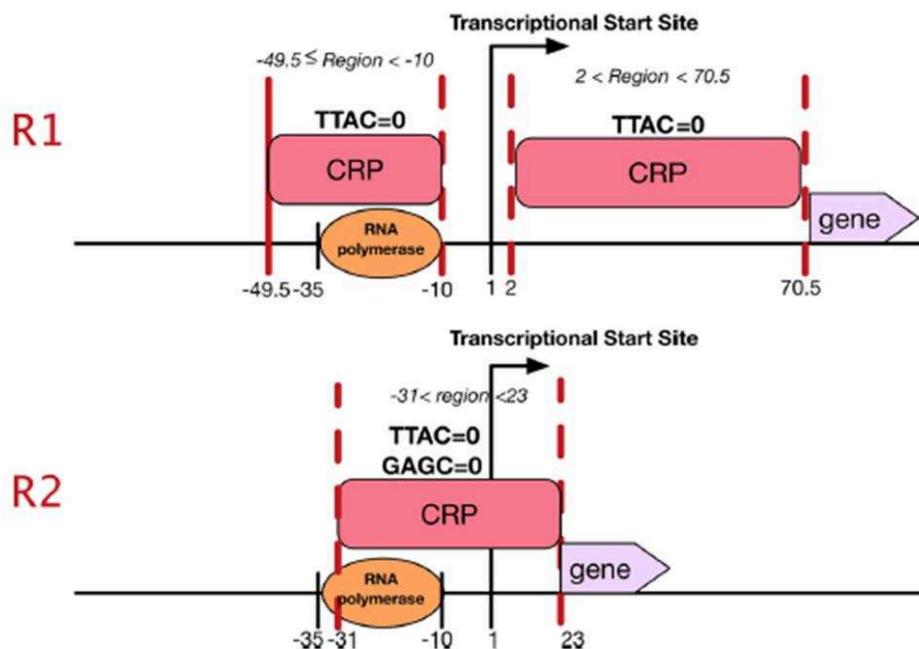


Figure 41: Représentations schématiques des promoteurs de classe R1 et R2 dont l'expression est réprimée par la CRP^{Ec} (en rouge). Les séquences codantes du gène contrôlé par la CRP^{Ec} sont visualisées en rose clair. Le site d'initiation de la transcription +1 est indiqué par une flèche noire (d'après (Tsai et al., 2018)).

Un site cible de la CRP^{Ec} a été identifié en aval de la séquence codante du gène *crp* et il a été démontré in vitro que la transcription du gène *crp* est négativement régulée par le complexe CRP^{Ec}-AMPc de même que la transcription du gène *cyaA*, codant l'adénylate cyclase, l'enzyme responsable de la synthèse de l'AMPc (Aiba, 1983).

Grainger et ses collaborateurs (Grainger et al., 2005) ont par ailleurs montré que la CRP^{Ec} interagit avec de nombreux sites intragéniques, distribués tout le long du chromosome. Il a donc été proposé que la CRP^{Ec} agisse également en tant qu'organisateur du chromosome ou protéine NAP (nucleoid associated protein).

c- Lien entre la répression catabolique et l'activation allostérique de la CRP^{Ec}

L'AMPc est synthétisé à partir de l'ATP, par des adénylates cyclases, et dégradé en AMP par la phosphodiesterase CpdA (Gancedo, 2013). *E. coli* possède une seule adénylate cyclase (CyaA) dont l'activité est soumise à ce que l'on appelle la répression catabolique. La répression catabolique est un mécanisme régulateur permettant à la bactérie d'utiliser préférentiellement une source de carbone rapidement métabolisable (comme le glucose) en inhibant le transport et la synthèse des enzymes et perméases impliqués dans le métabolisme des sources de carbone secondaires (comme le glycérol). Chez *E. coli*, la répression catabolique implique l'enzyme EIIA^{Glc} sous forme phosphorylée, l'adénylate cyclase CyaA et la CRP^{Ec} en complexe avec l'AMPc. En effet, le glucose est transporté et phosphorylé dans le milieu intracellulaire (sous forme de glucose-6-phosphate) par le système PTS (phosphotransférase system) (Bettenbrock et al., 2007). Le système PTS (**Figure 42**) est constitué des protéines EI, HPr, EIIA^{Glc}, EIIB^{Glc} et de la protéine membranaire EIIC^{Glc}, qui forment une cascade de phosphorylation de protéines, en transférant séquentiellement un groupement phosphate du phosphoénolpyruvate (PEP) jusqu'au glucose pour former du glucose-6-phosphate (Deutscher, 2008).

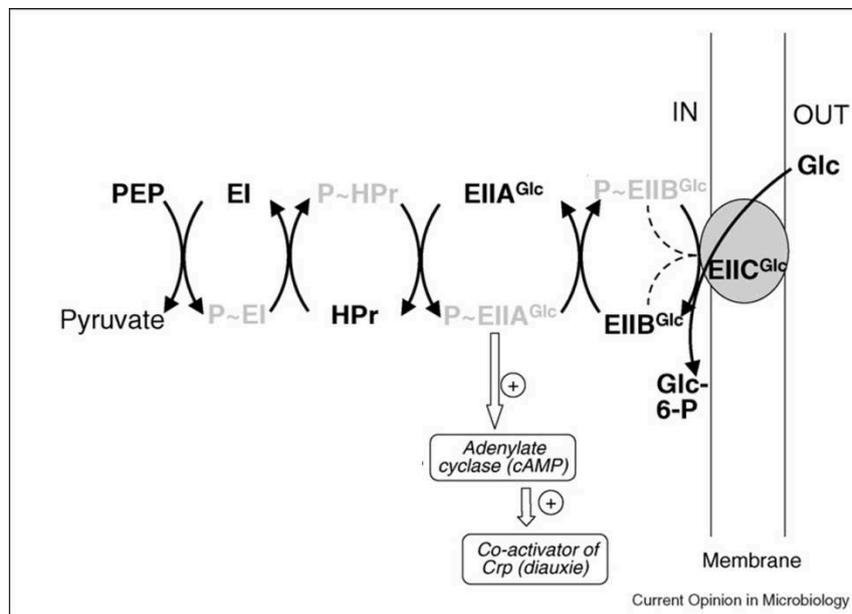


Figure 42: Lien entre le système PTS et l'adénylate cyclase, l'enzyme responsable de la synthèse de l'AMPc. PEP: phosphoénolpyruvate, Glc: glucose, Glc-6-P: glucose-6-phosphate (adapté de (Deutscher, 2008)).

Les composants du système PTS sont présents dans la cellule sous forme déphosphorylée (en noir dans la **figure 42**) ou sous une forme phosphorylée (en gris dans la **figure 42**). Suivant

leur état de phosphorylation, les protéines PTS sont impliquées dans de nombreuses fonctions régulatrices en interagissant ou phosphorylant leurs protéines cibles. L'état de phosphorylation des protéines PTS est bas lorsque le transporteur de glucose est saturé. En revanche, lorsque le glucose est absent du milieu extracellulaire, les protéines PTS phosphorylées s'accumulent dans la cellule. L'enzyme EIIA^{Glc} sous forme phosphorylée stimule l'activité de l'adénylate cyclase ((Bettenbrock et al., 2007; Deutscher, 2008; Green et al., 2014; Park et al., 2006), **figure 42**), ce qui augmente la synthèse d'AMPc et active la protéine CRP^{Ec} qui va alors induire l'expression des gènes impliqués dans le catabolisme des autres sources de carbone (par exemple l'opéron lac afin de cataboliser le lactose) (Cooper et al., 2008; Zheng et al., 2004).

2°) Exemples d'autres membres de la sous-famille CRP

Les fonctions biologiques régulées par les protéines de la sous-famille CRP sont très diverses au sein des bactéries. Même si les gènes régulés par les protéines CRP ne font pas systématiquement partie du métabolisme primaire, ils exercent des fonctions importantes pour la physiologie des différentes espèces bactériennes (Soberon-Chavez et al., 2017). **Le tableau 3** résume les fonctions biologiques régulées par les protéines CRP dans différentes espèces bactériennes.

Chez *Vibrio cholerae* en plus de son rôle dans la régulation de la répression catabolique, la CRP^{Vc} contrôle l'expression de gènes impliqués dans la dégradation de la chitine, la compétence (Blokesch, 2012), la formation des biofilms (Fong & Yildiz, 2008) et la production des facteurs de virulence (Liang et al., 2007).

Bactéries	Groupe phylogénétique	Nom	Site de fixation à l'ADN similaire à TGTGAN6TCACA	Complémentation hétérologue du mutant Δ crp de E. coli	% d'identité en acides aminés avec CRP ^{Ec} de E. coli	Rôle physiologique	Ligand	Références
Escherichia coli	γ -protéobactérie	CRP ^{Ec}	oui	oui	100	répression catabolite	AMPc	(Gosset et al., 2004; Zheng et al., 2004)
Vibrio cholerae	γ -protéobactérie	CRP ^{Vc}	oui	oui	95	production des facteurs de virulence, quorum-sensing, compétence, formation de biofilm, utilisation de la chitine	AMPc	(Blakesch, 2012; Fong & Yildiz, 2008; Liang et al., 2007)
Pseudomonas aeruginosa	γ -protéobactérie	Vfr	oui	oui	61	production des facteurs de virulence, quorum-sensing	-	(Albus et al., 1997; Beatson et al., 2002; Fuchs et al., 2010)
Pseudomonas putida	γ -protéobactérie	CRP ^{Pp}	oui	oui	62	assimilation des dipeptides, dégradation des acides aminés aromatiques	AMPc	(Herrera et al., 2012; Milanesio et al., 2011)
Xanthomonas campestris	γ -protéobactérie	Clp	oui	oui	45	régulation de la pathogénéicité, quorum-sensing, la production de la xanthine et des biofilms	-	(Chin et al., 2010 ; Chou, 2011; Lu et al., 2012)
Haemophilus influenzae	γ -protéobactérie	CRP ^{Hi}	oui	*	76	compétence	AMPc	(Chandler et al., 1992; Redfield et al., 2005)
Sinorhizobium meliloti	α - protéobactérie	Clr	oui	non déterminée	23	réponse au stress osmotique et la motilité	AMPc et GMPc	(Krol et al., 2016; Tian et al., 2012)
Rhodospirillum centenum	α - protéobactérie	CgrA	oui	non déterminée	22	développement des cystes	GMPc	(Marden et al., 2011; Roychowdhury, Dong & Bauer, 2015)
Mycobacterium tuberculosis	actinobactérie	CRP ^{Mt}	oui	oui	32	transition de la pathogénéicité entre un état répliatif et non répliatif	AMPc	(Akhter, Tundup & Hasnain, 2007; Akhter et al., 2008)
Streptomyces coelicolor	actinobactérie	CRP ^{Sc}	non	non	28	métabolisme secondaire, production d'antibiotique et le contrôle du développement	AMPc	(Derouaux et al., 2004; Gao et al., 2012)
C. glutamicum	actinobactérie	GlxR	oui	oui	29	bypass glyoxylate et la régulation de la production des acides aminés	AMPc	(Kim et al., 2004a; Kohl & Tauch, 2009)
Thermus thermophilus	deinococcus-thermus	SdrP	-	non déterminée	22	assimilation des nutriments, métabolisme des acides nucléiques, contrôle qualité des protéines et la réponse au stress oxydant	-	(Agari et al., 2008; Agari, Kuramitsu & Shinkai, 2010)

Tableau 3: Caractéristiques de plusieurs membres de la sous-famille CRP (adapté de (Soberon-Chavez et al., 2017)). * L'expression du gène crp^{Ec} de E. coli dans un mutant Δ crp^{Hi} de H. influenzae restaure l'efficacité de transformation.

Chez *Pseudomonas aeruginosa*, Vfr l'homologue de la CRP^{Ec}, est impliquée dans le contrôle de la virulence (Albus et al., 1997), de la motilité de type « twitching » (Beatson et al., 2002) et du système de sécrétion de type III (Marsden et al., 2016). Chez *Pseudomonas putida*, la CRP régule l'expression de gènes impliqués dans la dégradation des acides aminés aromatiques (Herrera et al., 2012) et l'assimilation des dipeptides (Milanesio et al., 2011). Bien que *P. aeruginosa* et *P. putida* soient phylogénétiquement proches, leurs protéines CRP exercent des fonctions très différentes.

Chez la bactérie phytopathogène *Xanthomonas campestris*, Clp (CRP-like protein) régule l'expression des gènes impliqués dans la production de la xanthine, un exopolysaccharide (EPS) (Chen et al., 2010a), mais aussi des facteurs de virulence (Chin et al., 2010) et des gènes impliqués dans la formation des biofilms (Lu et al., 2012).

Chez *Sinorhizobium meliloti*, Clr active directement l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des exopolysaccharides, la réponse au stress osmotique et la motilité de type « swimming » (Krol et al., 2016).

Chez *Haemophilus influenzae*, la CRP joue un rôle crucial dans la compétence de la bactérie (Chandler, 1992; Redfield et al., 2005).

Parmi les actinobactéries, CRP^{Sco} présent chez *Streptomyces coelicolor*, contrôle l'expression des gènes impliqués dans la production des antibiotiques et la germination des spores (Derouaux et al., 2004; Gao et al., 2012). Chez *Corynebacterium glutamicum*, GlxR régule l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des carbohydrates, la dégradation des composés aromatiques, le métabolisme du glutamate et de l'azote, la biosynthèse des acides gras, la respiration et dans la synthèse des acides aminés (Kohl et al., 2008; Kohl & Tauch, 2009). Dans le cas de *Mycobacterium tuberculosis*, la CRP^{Mt} régule l'expression des gènes impliqués dans la pathogénicité (Akhter et al., 2007; Akhter et al., 2008).

Chez *T. thermophilus*, appartenant au phylum Deinococcus-Thermus, le gène sdrP (stationary phase-dependant regulatory protein) est induit d'un facteur 10 au cours de la phase stationnaire. Il est par ailleurs fortement induit après l'exposition des cellules au peroxyde d'hydrogène, la diamide, à l'antibiotique tétracycline, au sel (NaCl), à éthanol et par la présence de métaux lourds (ZnSO₄, CuSO₄), ce qui suggère que la protéine SdrP est impliquée dans la réponse cellulaire mise en place chez *T. thermophilus* pour surmonter des stress environnementaux ou chimiques très variés (Agari et al., 2008; Agari et al., 2010). Il joue le rôle d'activateur transcriptionnel de plusieurs gènes impliqués dans le contrôle redox, l'assimilation des nutriments et de l'énergie, le métabolisme des acides nucléiques, le contrôle qualité des protéines et la réponse au stress oxydant (Agari et al., 2010). L'alignement des 22

promoteurs des gènes directement activés par SdrP, a permis d'identifier le motif TTGTGn9CnC, comme site cible de fixation de SdrP (Agari et al., 2010).

Dans la majorité des cas, l'interaction des facteurs de transcription de la sous-famille CRP avec l'AMPc est nécessaire à leur capacité à réguler l'expression de leurs gènes cibles (Soberon-Chavez et al., 2017). C'est par exemple le cas de la CRP^{Ec} de *E. coli*, CRP^{Vc} de *V. cholerae*, CRP^{Pp} de *P. putida*, Clr de *S. meliloti*, CRP^{Mt} de *M. tuberculosis*, CRP^{Sco} de *S. coelicolor*, GlxR de *C. glutamicum* (**Tableau 3**). En revanche, il a été démontré que Vfr de *P. aeruginosa*, SdrP de *T. thermophilus* (Agari et al., 2008 ; Agari et al., 2010) et Clp de *X. campestris* ne nécessitent la présence d'aucun effecteur pour fixer leur séquence cible (**Tableau 3**). La protéine CgrA de *Rhodospirillum centenum* a besoin quant à elle, de la présence de GMPc pour se fixer de manière spécifique à sa séquence cible (Marden et al., 2011; Roychowdhury et al., 2015).

Les changements de la concentration d'AMPc sont perçus par les protéines CRP, qui réagissent avec des sensibilités différentes, selon le niveau d'AMPc produit par la bactérie et la niche écologique occupée par les différentes espèces bactériennes (Green et al., 2014).

L'AMPc joue un rôle central dans la pathogénicité de *M. tuberculosis*. En effet, il a été démontré que ce bacille sécrète des quantités importantes d'AMPc pour intoxiquer les macrophages de son organisme hôte (Agarwal & Bishai, 2009; Bai, Schaak & McDonough, 2009). Contrairement à *E. coli* qui possède une seule adénylate cyclase, *M. tuberculosis* possède au moins 16 adénylates cyclases, dont l'activité est affectée par des variations de pH, de CO₂ etc (Chakraborti et al., 2011). Par ailleurs, *M. tuberculosis* possède une seule phosphodiesterase, dont l'activité mesurée in vitro et in vivo est faible (Shenoy et al., 2005). L'ensemble de ces données suggère que la bactérie *M. tuberculosis* vit dans un environnement où les concentrations d'AMPc sont particulièrement élevées. La CRP^{Mt} possède 4 des 6 acides aminés clés, impliqués dans l'interaction avec l'AMPc. La sérine 128, qui joue un rôle majeur dans le changement conformationnel de la protéine CRP^{Ec} suite à la fixation de l'AMPc, est remplacée par une asparagine chez CRP^{Mt}. La constante de dissociation K_D de l'AMPc est d'environ 60 µM, comparé à 13-16 µM chez *E. coli* (Green et al., 2014). Des études cristallographiques de la structure de l'apo-CRP^{Mt} et la CRP^{Mt} complexé à l'AMPc chez *M. tuberculosis*, montrent que la fixation de l'AMPc est associée à un réarrangement structural nettement moins conséquent que celui observé dans la CRP^{Ec} de *E. coli* (**Figures 38 et 43**). La modification majeure qui se produit dans la CRP^{Mt} suite à la fixation de l'AMPc, est l'affaiblissement de l'interaction entre le domaine senseur N-terminal et le domaine C-terminal, résultant en une augmentation de la liberté spatiale du domaine de fixation à l'ADN,

ce qui accroît d'un facteur 2 (Rickman et al., 2005) l'affinité in vitro de la CRP^{Mt} pour les régions promotrices de ses gènes cibles (Gallagher et al., 2009; Kumar et al., 2010; Reddy et al., 2009). Contrairement à la CRP^{Ec} de *E. coli*, l'apo-CRP^{Mt} est capable de se fixer spécifiquement aux régions promotrices de ses gènes cibles et de réguler leur expression (Stapleton et al., 2010). Il a donc été proposé que la faible affinité de CRP^{Mt} pour l'AMPc, soit un moyen de désensibiliser la protéine du bruit de fond d'AMPc, requis pour intoxiquer l'hôte durant l'infection et de maintenir un certain degré de réactivité à des concentrations élevées d'AMPc (Green et al., 2014).

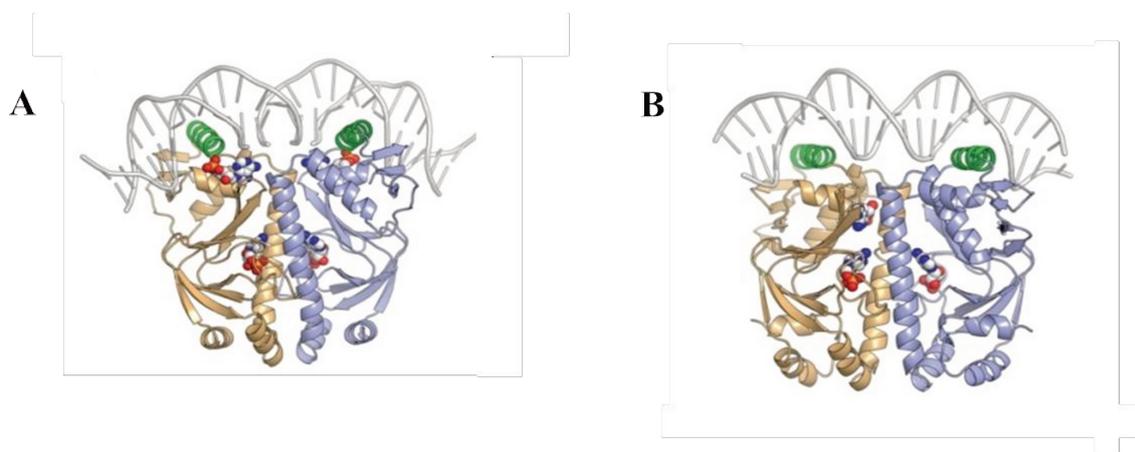


Figure 43 : Représentation de la structure tridimensionnelle de la protéine CRP^{Mt} en absence (A) ou présence (B) d'AMPc. Chaque monomère est représenté par deux couleurs différentes (marron et bleu), les hélices α F impliquées dans la reconnaissance spécifique de l'ADN sont représentées en vert (d'après (Green et al., 2014)).

A l'inverse, *P. putida*, une bactérie saprophyte du sol, possède 2 adénylates cyclases, qui synthétisent une quantité très faible d'AMPc dans la cellule (Green et al., 2014; Milanesio et al., 2011). La CRP^{Pp} possède 5 des 6 acides aminés clés, impliqués dans l'interaction avec l'AMPc. En accord avec les concentrations intracellulaires très faibles d'AMPc, la CRP^{Pp} a une affinité très élevée pour l'AMPc, avec une constante de dissociation K_D d'environ 23 nM (Green et al., 2014). Des expériences in vitro, montrent que l'affinité de la CRP^{Pp} pour des séquences d'ADN spécifiques augmente d'un facteur 10 en présence d'AMPc (Arce-Rodriguez et al., 2012). Bien que la structure tridimensionnelle de la protéine CRP^{Pp} n'ait pas encore été déterminée, la forte affinité de la CRP^{Pp} pour l'AMPc suggère des réarrangements structuraux importants de la protéine suite à la fixation de l'AMPc.

A l'opposé, les analyses structurales montrent que l'apo-Clp de *X. campestris* et l'apo-SdrP de *T. thermophilus* qui ne nécessitent aucun effecteur pour se fixer spécifiquement à l'ADN, présentent une conformation structurale qui permet au domaine C-terminal de fixation à

l'ADN d'interagir directement avec ses sites cibles et de réguler l'expression des gènes en aval (Agari et al., 2008; Chou, 2011).

Par ailleurs, il est frappant de constater que les régulateurs de la sous-famille CRP reconnaissent des séquences d'ADN spécifiques, qui sont conservées, même au sein d'espèces bactériennes éloignées phylogénétiquement, telles que les protéobactéries (*E. coli*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa* etc), les actinobactéries (*M. tuberculosis*, *C. glutamicum*), etc. (**Tableau 3**). Les séquences d'ADN consensus reconnues par la CRP^{Ec} de *E. coli*, la CRP^{Mt} de *M. tuberculosis*, GlxR de *C. glutamicum* et la CRP^{Hi} de *H. influenzae* sont indiquées dans la **Figure 44**.

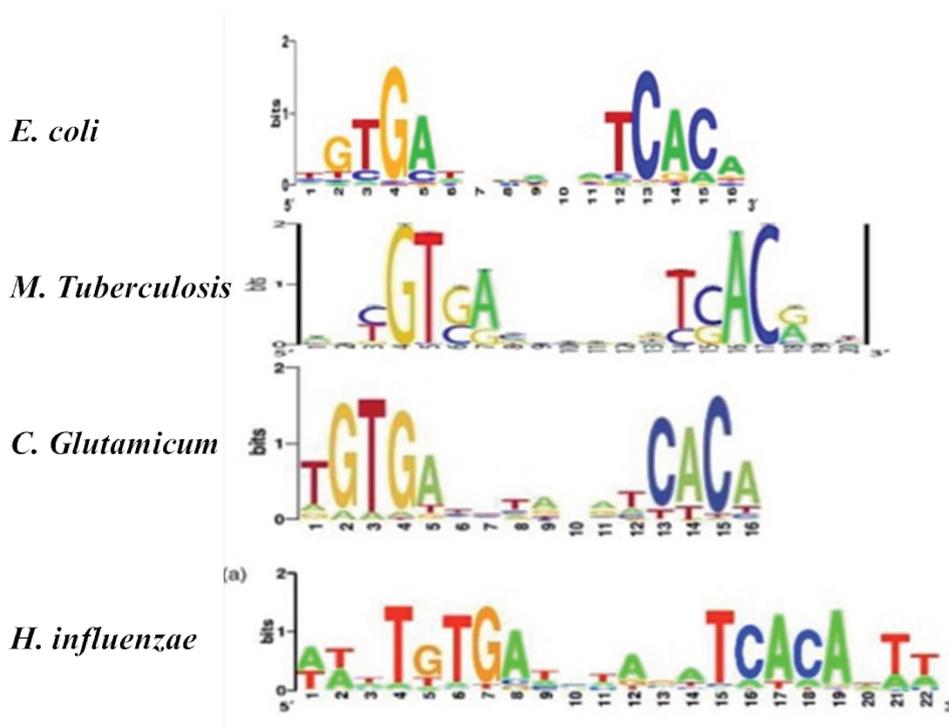


Figure 44: Les régulateurs transcriptionnels de la sous-famille CRP reconnaissent des séquences d'ADN conservées au sein de différentes espèces bactériennes (Bai, McCue & McDonough, 2005; Kohl et al., 2008; Redfield et al., 2005; Shimada et al., 2011).

En accord avec ces résultats, il a été démontré par des expériences de complémentation hétérologue, que l'expression des gènes codant les protéines CRP^{Vc} de *V. cholerae*, Vfr de *P. aeruginosa*, CRP^{Pp} *P. putida*, Clp de *X. campestris*, CRP^{Mt} de *M. tuberculosis*, GlxR de *C. glutamicum* dans un mutant Δcrp^{Ec} de *E. coli* restaure sa capacité à assimiler diverses sources de carbone ((Soberon-Chavez et al., 2017); **Tableau 3**). La protéine CRP^{Sco} de *Streptomyces coelicolor* n'a pas la capacité à fixer une séquence d'ADN similaire à celle de la CRP^{Ec}, mais des analyses de modélisation de structure montrent que le domaine de fixation à l'ADN de

CRP^{Sc0} a une organisation inhabituelle, suggérant l'existence d'un mécanisme de fixation à l'ADN différent des autres membres de la sous-famille CRP (Derouaux et al., 2004).

Chez *D. radiodurans*, 4 gènes codant des protéines homologues de la famille CRP/FNR (ddrI, dr1646, dr2362, and dr0834) ont été identifiés dans son génome.

ARTICLE 1:

**DdrI, a cAMP Receptor Protein Family Member,
Acts as a Major Regulator for Adaptation of
Deinococcus radiodurans to Various Stresses.**



Ddrl, a cAMP Receptor Protein Family Member, Acts as a Major Regulator for Adaptation of *Deinococcus radiodurans* to Various Stresses

Laura Meyer,^a Geneviève Coste,^a Suzanne Sommer,^a Jacques Oberto,^a Fabrice Confalonieri,^a Pascale Servant,^a Cécile Pasternak^{a*}

^aInstitute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France

ABSTRACT The DNA damage response *ddrl* gene encodes a transcription regulator belonging to the cAMP receptor protein (CRP) family. Cells devoid of the Ddrl protein exhibit a pleiotropic phenotype, including growth defects and sensitivity to DNA-damaging agents and to oxidative stress. Here, we show that the absence of the Ddrl protein also confers sensitivity to heat shock treatment, and several genes involved in heat shock response were shown to be upregulated in a Ddrl-dependent manner. Interestingly, expression of the *Escherichia coli* CRP partially compensates for the absence of the Ddrl protein. Microscopic observations of $\Delta ddrl$ mutant cells revealed an increased proportion of two-tetrad and anucleated cells in the population compared to the wild-type strain, indicating that Ddrl is crucial for the completion of cell division and/or chromosome segregation. We show that Ddrl is also involved in the megaplasmid MP1 stability and in efficient plasmid transformation by facilitating the maintenance of the incoming plasmid in the cell. The *in silico* prediction of putative Ddrl binding sites in the *D. radiodurans* genome suggests that hundreds of genes, belonging to several functional groups, may be regulated by Ddrl. In addition, the Ddrl protein absolutely requires cAMP for *in vitro* binding to specific target sequences, and it acts as a dimer. All these data underline the major role of Ddrl in *D. radiodurans* physiology under normal and stress conditions by regulating, both directly and indirectly, a cohort of genes involved in various cellular processes, including central metabolism and specific responses to diverse harmful environments.

IMPORTANCE *Deinococcus radiodurans* has been extensively studied to elucidate the molecular mechanisms responsible for its exceptional ability to withstand lethal effects of various DNA-damaging agents. A complex network, including efficient DNA repair, protein protection against oxidation, and diverse metabolic pathways, plays a crucial role for its radioresistance. The regulatory networks orchestrating these various pathways are still missing. Our data provide new insights into the crucial contribution of the transcription factor Ddrl for the *D. radiodurans* ability to withstand harmful conditions, including UV radiation, mitomycin C treatment, heat shock, and oxidative stress. Finally, we highlight that Ddrl is also required for accurate cell division, for maintenance of plasmid replicons, and for central metabolism processes responsible for the overall cell physiology.

KEYWORDS *Deinococcus radiodurans*, CRP family, cAMP signaling, transcription regulator, heat shock response, plasmid maintenance

The molecular mechanisms contributing to the impressive capacity of *Deinococcus radiodurans* to withstand very harmful genotoxic stresses, including ionizing and UV radiation, desiccation, and reactive oxygen species (ROS), are now well documented (for recent reviews, see references 1–4). These include very efficient DNA repair mech-

Received 2 March 2018 Accepted 16 April 2018

Accepted manuscript posted online 23 April 2018

Citation Meyer L, Coste G, Sommer S, Oberto J, Confalonieri F, Servant P, Pasternak C. 2018. Ddrl, a cAMP receptor protein family member, acts as a major regulator for adaptation of *Deinococcus radiodurans* to various stresses. *J Bacteriol* 200:e00129-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00129-18>.

Editor Ann M. Stock, Rutgers University–Robert Wood Johnson Medical School

Copyright © 2018 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Cécile Pasternak, cecile.pasternak@unilim.fr.

* Present address: Cécile Pasternak, Université Limoges, INSERM, CHU Limoges, UMR 1092, Limoges, France.

P.S. and C.P. are co-senior authors.

organisms encoded by *D. radiodurans* to reassemble an intact genome from hundreds of DNA fragments (5–7) and a compact structure of the nucleoid maintained after irradiation which may favor DNA double-strand break (DSB) repair by avoiding dispersion of DNA fragments (8, 9). *D. radiodurans* also possesses very efficient ROS detoxification pathways, including both enzymatic and nonenzymatic systems (for reviews, see references 2 and 10) and protects its genome by limiting iron import and concomitant Fenton reactions (11). In addition, the radiation-resistant *Deinococcus* species share an upregulation of specific DNA damage response (*ddr*) genes following irradiation or desiccation (12). Recently, a screening of a transposon insertion mutant library exposed to different genotoxic stresses has identified a combination of various metabolic and structural functions involved in the extreme radioresistance of *D. radiodurans* (13). Nevertheless, the regulatory networks orchestrating these various pathways remain to be elucidated.

Although *D. radiodurans* encodes two homologues of the *Escherichia coli* SOS response LexA repressor, LexA1 and LexA2, with self-protease activity stimulated by a mechanism requiring RecA, the physiological targets of these two potential repressors are still unidentified (14–16). Instead, another regulation pathway involving the IrrE metalloprotease and its cognate substrate, the DdrO repressor, has been shown to play a major regulatory role after exposure to ionizing radiation in both *Deinococcus deserti* (17) and *D. radiodurans* (18, 19). The IrrE metalloprotease from *D. deserti* cleaves the DdrO protein in response to gamma-ray exposure, allowing the induction of genes involved in DNA DSB repair (17). This pathway controls the radiation desiccation response (RDR) regulon, shared by several *Deinococcus* species (20, 21), and a regulatory RDR motif (RDRM) palindromic sequence was found upstream of the coding sequence of the RDR regulon members. In *D. radiodurans*, this regulon includes at least *recA*, *gyrA*, and *Deinococcus*-specific genes, like the *ddrB*, *pprA*, and *ddrC* genes. *ddrB* encodes an essential function for the single-strand annealing (SSA) repair mechanism (7, 22). All of these genes are repressed by DdrO in the absence of any genotoxic stress (18, 23, 24).

Another transcriptional regulator, DrRRA, crucial for the extreme resistance of *D. radiodurans* to gamma and UV irradiation, H₂O₂ exposure, and desiccation has been identified (25). It belongs to the response regulators of two-component systems, but its cognate histidine kinase is still unknown. Transcriptome analyses of the Δ *drRRA* mutant revealed impaired induction of numerous genes after gamma-ray exposure, including *recA*, *pprA*, and *uvr* (ultraviolet radiation) DNA repair genes; *kata* and *katE*, encoding catalases; *sodA* and *sodC*, encoding superoxide dismutases; and genes encoding thioredoxin and ferritin/Dps-like proteins (25).

The *ddrI* gene (*dr0997*) was initially identified by transcriptome analyses of *D. radiodurans* as induced 4-fold following gamma-ray exposure (3 kilogray [kGy]) and 11-fold after desiccation (12). We have recently demonstrated that inactivation of *ddrI* by transposon insertion sensitizes *D. radiodurans* to gamma and UV irradiation, mitomycin C (MMC), and H₂O₂ (13). Yang et al. confirmed that a deletion of the *ddrI* gene sensitizes cells to these harmful conditions, suggesting an important role of DdrI in the cellular response of *D. radiodurans* to DNA damage and oxidative stress (26). Moreover, the absence of DdrI results in slow bacterial growth (26). The transcription of *ddrI* is induced by the response regulator DrRRA following gamma irradiation, and purified DrRRA binds to the *ddrI* promoter region (25). The DdrI protein exhibits typical features of the transcription factors belonging to the cAMP receptor protein (CRP) family, including an effector cyclic nucleotide monophosphate (cNMP)-binding domain at the N-terminal end, and a helix-turn-helix (HTH) DNA-binding domain at the C-terminal end (26). In *E. coli*, the expression of several dozen genes is regulated by CRP, including many genes involved in central carbon metabolism and transport of various metabolites (27). In *D. radiodurans*, it has been shown that the transcription of 18 genes encoding proteins mainly involved in metabolic pathways or DNA repair mechanisms is directly regulated by the DdrI protein (26).

In this study, we showed that the *E. coli* CRP can partially restore resistance to

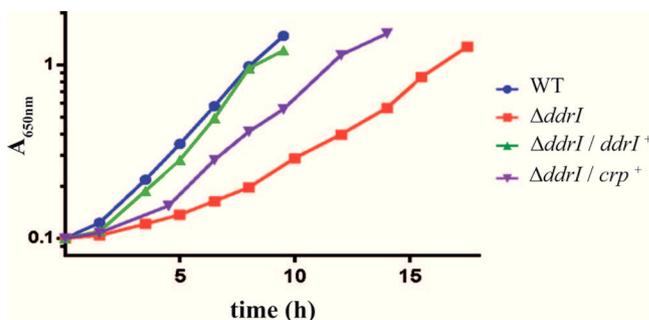


FIG 1 The $\Delta ddrI$ mutant displays severe growth defects partially complemented by the expression of the *E. coli* CRP. GY9613 (wild type [WT]), GY13630 ($\Delta ddrI$ mutant), GY13643 ($\Delta ddrI/ddrI^+$ complemented strain), and GY13644 ($\Delta ddrI/crp^+$ mutant) strains were grown at 30°C in TGY2X medium (supplemented with spectinomycin and 1 mM IPTG for the GY13644 strain). The A_{650} values of the cultures were measured and generation times calculated from 3 independent experiments.

DNA-damaging agents and oxidative stress and complements the growth defect of *D. radiodurans* cells devoid of the DdrI protein. The *in silico* prediction of potential DdrI binding sites in the *D. radiodurans* genome suggests that hundreds of genes, belonging to several functional groups, may be regulated by DdrI. We showed that DdrI is involved in the heat shock response, regulation of cell division and/or chromosome segregation, stability of the megaplasmid MP1, and efficient plasmid transformation by facilitating the maintenance of the incoming plasmid in the cell. Moreover, we demonstrate that DdrI absolutely requires cAMP for *in vitro* binding to its specific DNA target and acts as a dimer. All these data underline the important regulatory role of DdrI in the adaptation of *D. radiodurans* to various stresses.

RESULTS

The *ddrI* locus is transcribed as a monocistronic unit. The *ddrI* locus *dr0997* is located 178 bp upstream of a putative operon starting from *dr0998* and ending at *dr1000* (see Fig. S1 in the supplemental material), putatively encoding a member of the multiresistance and pH adaptation (MRP) family, a putative transcription regulator, and a 2'-5' RNA ligase, respectively. Whereas a stem-loop structure forming a Rho-independent transcription terminator was found downstream of *dr1000*, there was no evidence for the presence of such a transcription terminator in the intergenic region between *dr0997* and *dr0998*. To test if a *ddrI* deletion interferes with the expression of downstream genes, we assessed the presence of a putative operon from *dr0997* to *dr1000*. The reverse transcription-PCR (RT-PCR) products for each coding sequence, as well as fragments overlapping *dr0998* and *dr0999* or *dr0999* and *dr1000*, were amplified using cDNA synthesized from total *D. radiodurans* RNA as the template. No RT-PCR product was detected with one primer located in *dr0997* and the other in *dr0998*, whereas an internal fragment of *dr0997* was efficiently amplified (Fig. S1). Moreover, RT-PCR products beginning in *dr0998* and ending in *dr0999* or beginning in *dr0999* and ending in *dr1000* were amplified when *dr0997* was deleted (Fig. S1). Therefore, *dr0997* appeared to be transcribed as a monocistronic unit, upstream of the operon starting from *dr0998* and ending at *dr1000*.

Expression of the *E. coli* CRP partially complemented growth defects and sensitivity to various stresses of the *D. radiodurans ddrI* deletion mutant. As previously shown by Yang et al. (26), the $\Delta ddrI$ null mutant exhibited a dramatic growth deficiency fully complemented by expression of the DdrI protein (Fig. 1). Interestingly, we show here that *trans* expression of the *E. coli* CRP in cells devoid of the DdrI protein resulted in a partial restoration of growth, with cells exhibiting a doubling time of 195 (± 6) min compared to 304 (± 10) min for the $\Delta ddrI$ mutant strain and 120 (± 9) min for the wild-type parental R1 strain when cultivated under standard growth conditions (Fig. 1). We also show that heterologous expression of the *E. coli* CRP in the $\Delta ddrI$ mutant partially restored resistance to genotoxic agents, such as MMC and ultraviolet radiation

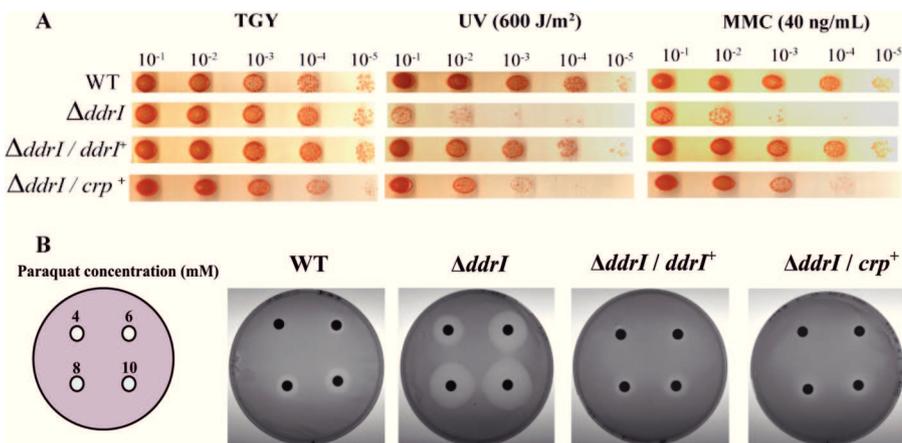


FIG 2 Expression of *E. coli* CRP in the *ΔddrI* mutant partially restores resistance to UVC, mitomycin C (MMC), and Paraquat. (A) Sensitivity assays of *D. radiodurans* to UVC and mitomycin C (MMC). GY9613 (wild type), GY13630 (*ΔddrI* mutant), GY13643 (*ΔddrI/ddrI*⁺ complemented strain), and GY13644 (*ΔddrI/crp*⁺ mutant) strains were grown to an A_{650} of 1, and appropriate dilutions (top) were spotted onto TGY agar plates exposed or not exposed to UVC rays (600 J/m²) or MMC (40 ng/ml). TGY agar plates were supplemented with spectinomycin and 1 mM IPTG for the GY13644 strain. (B) Sensitivity assays of *D. radiodurans* to oxidative stress generated by Paraquat. Exponential-phase cultures (A_{650} , 0.5) of GY9613, GY13630, GY13643, and GY13644 were spread on TGY plates or TGY agar plates supplemented with spectinomycin and 1 mM IPTG for strain GY13644, and 10 μ l of Paraquat (at the indicated concentrations, left) was spotted onto filter paper discs. After incubation at 30°C for 2 days, the diameters of the growth inhibition zones were measured.

(UVC) (Fig. 2A), and to oxidative stress, as shown by the diameters of the growth inhibition zones surrounding discs on which Paraquat (dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride) was spotted (Fig. 2B). These results strongly suggest that the *E. coli* CRP shared several common targets with the DdrI protein and regulated gene expression to restore efficient cell growth and resistance to harmful conditions.

In silico prediction of potential DdrI targets. The complementation experiments described above suggest a high similarity between the binding sites of *E. coli* CRP and the *D. radiodurans* DdrI protein. Potential DdrI sites were therefore predicted using CRP sites determined experimentally. The *E. coli* CRP box is characterized by the 5'-TGTG A-N₆-TCACA-3' consensus sequence (the most conserved bases are underlined) (27). The DNA motifs recognized by CRP homologs are well conserved among a variety of bacterial species, including the GlxR factor of *Corynebacterium glutamicum* (28), the CRP of *Mycobacterium tuberculosis* (CRP_{Mt}) (29), and the CRP of *Haemophilus influenzae* (30) (Fig. S2). CRP and related regulators are able to recognize and bind to relatively divergent sites, reflected by the relatively low informational content of their consensus sequence.

The *in silico* prediction of potential DdrI targets in the *D. radiodurans* genome was performed using the Fast Investigation Tool for Bacterial and Archeal Regulons (FITBAR) Web tool (<http://archaea.u-psud.fr/fitbar/>) (31) dedicated to the identification of specific protein-DNA-binding sites on fully sequenced prokaryotic genomes. For this analysis, we used the "CRP-*E. coli*" matrix, which contains the set of 166 intergenic CRP target sites listed in RegulonDB (<http://regulondb.ccg.unam.mx/>), identified by genomic SELEX (27), and experimentally validated. The information carried by the compilation of these 166 CRP binding sites weighs only 7.29 bits, as calculated according to Schneider et al. (32).

A total of 176 sites located upstream of genes at distances <650 bp were found in intergenic regions (Table S1). These potential DdrI targets may regulate the expression of hundreds of genes, including monocistronic units or genes belonging to operons located downstream of these putative DdrI targets, and at least 68 divergent genes indicated in Table S1 (Hua and Hua [33]; GenBank accession numbers CP015081.1 to CP015081.4). These target genes are clustered into several functional categories, in-

cluding DNA replication and repair, responses to oxidative stress and heat shock, signal transduction, carbohydrate metabolism, and transport, cell wall biogenesis, and lipid metabolism (Table S1). A matrix based on the set of these 176 potential DdrI sites was used in a second prediction to increase the informational content of the consensus sequence to 9.32 bits. With this additional information, 115 sites located upstream of genes at distances <650 bp were found in intergenic regions (Table S2). Among these 115 sites, 96 were among those present in Table S1, and 19 new sites were found when the 176 *D. radiodurans* binding sites were used to build the matrix.

We then defined a *D. radiodurans* consensus sequence [5'-TGTGA(N₆)TCACA-3'] (the palindromic sequence found in the consensus sequence is underlined) extrapolated by FITBAR from the 115 putative DdrI binding sites described in Table S2 (Fig. 3A). To assess the biological significance of this consensus sequence, we tested the ability of DdrI protein to bind to an 80-bp fragment containing, at position 33, the 5'-TGTGAAAAAACTCACA-3' sequence related to the DdrI putative recognition sequence. For this purpose, we performed electrophoretic mobility shift assay (EMSA) analysis using a purified DdrI protein containing an N-terminal His₆ tag, shown to be able to complement *in vivo* Δ *ddrI* mutant deficiencies (Fig. S3). We found that a band shift is observed using the His₆::DdrI protein, even in the presence of a large amount of a poly(dI-dC) competitor, but only when cAMP was added, as commonly observed for many *E. coli* CRP homologs (Fig. 3B). We also tested the binding of the His₆::DdrI protein to a variant of this consensus sequence (5'-TGTTAAAAAAACTTACA-3') (the nucleotides different from those found in the consensus sequence are indicated in bold), which is present in the promoter region of the *sodC* (*dr1546*) gene, listed in Tables S1 and S2, and showed that the His₆::DdrI protein also bound to this variant (Fig. S4).

The putative DdrI recognition sequence being palindromic, we tested the ability of the DdrI protein to form dimers and any involvement of cAMP in the dimerization process. We observed that DdrI was able to form dimers without the requirement of cAMP (Fig. 3C).

The DdrI regulon includes genes involved in response to heat shock. The *ddrI* gene was previously found among the 25 most highly upregulated genes upon heat shock treatment, as determined by microarray analysis (34). We therefore chose to investigate the effect of a *ddrI* deletion on the sensitivity of *D. radiodurans* to heat shock treatment. We found that cell viability decreased 1,000-fold in the absence of DdrI at 37°C, compared to wild-type cells grown under the same conditions, and cells devoid of DdrI were unable to grow at 39°C (Fig. 4A). The thermosensitive phenotype of the Δ *ddrI* mutant was completely suppressed by the expression of a chromosomal ectopic *ddrI* gene and, to a lesser extent, by plasmid-based expression of the heterologous CRP from *E. coli* (Fig. 4A). Compared to the wild-type strain, the expression of the *ddrI* gene was shown to decrease in a *drRRA* mutant after DNA-damaging treatment (25). Therefore, the expression of DdrI was studied by Western immunoblot analyses of cell extracts from the R1 or Δ *drRRA* mutant strain expressing the DdrI-FLAG-tagged protein when bacteria were exposed to heat shock. We also verified the functionality of the DdrI-FLAG protein to complement the *ddrI* deletion *in vivo* (Fig. S3). The expression of the DdrI-FLAG protein was induced in response to heat shock (0.5 or 1 h at 48°C) in the wild-type background, whereas in the Δ *drRRA* mutant, the DdrI-FLAG protein was undetectable at 30°C, as well as after heat shock treatment, indicating a DrRRA-dependent expression of the DdrI protein (Fig. 4B). Thus, we tested the heat sensitivity of cells devoid of DrRRA and found that they also exhibited a thermosensitive phenotype at 39°C (Fig. 4A).

To test a possible DdrI-dependent expression of heat shock genes, we compared the target genes of DdrI predicted *in silico* (Tables S1 and S2) with the genes or proteins whose expression was found to be increased by heat shock (34, 35). We chose to study in wild-type and DdrI-deficient cells at 30°C and after 5 min of incubation of the cells at 48°C, by quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR), the expression of genes that appeared from both approaches. We also included *dr0004* in our study since many

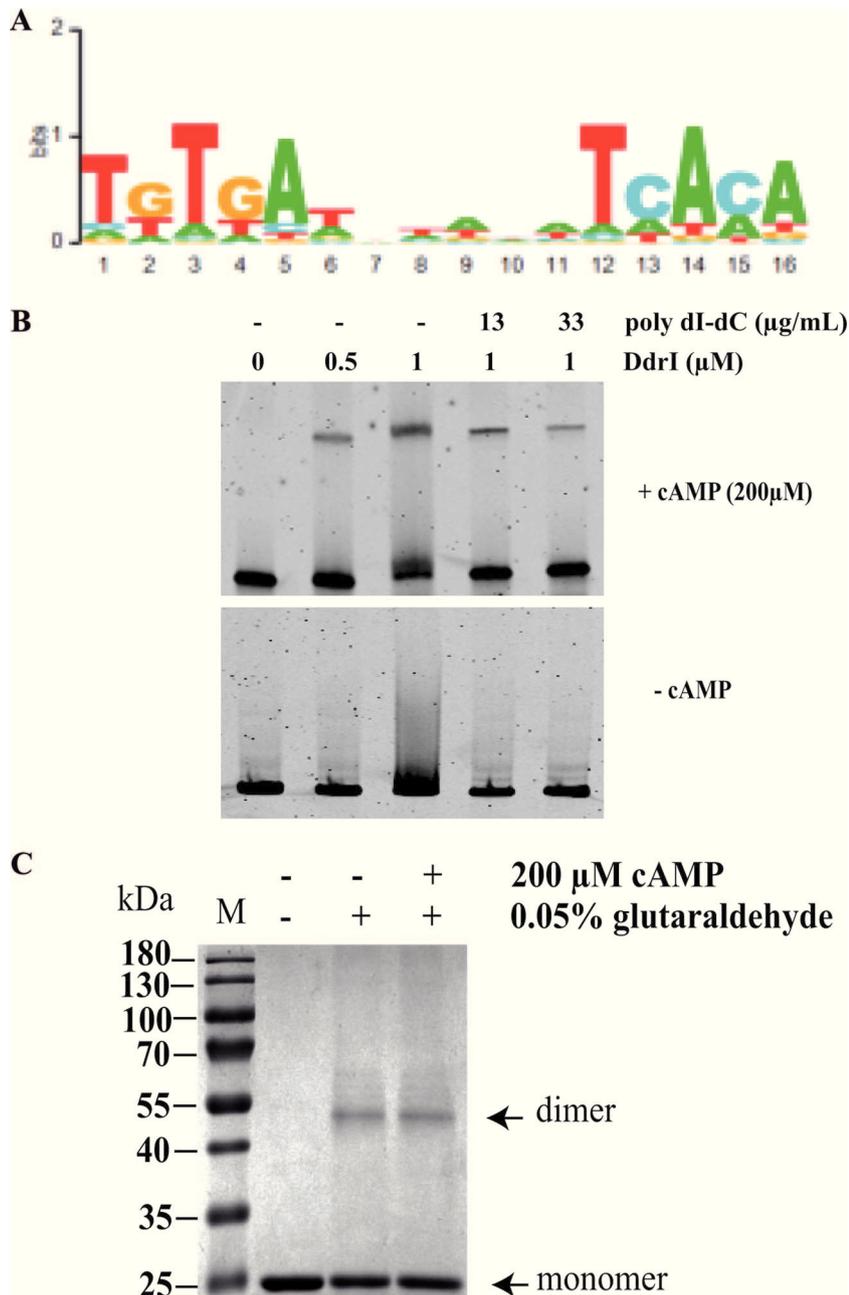


FIG 3 DdrI needs cAMP for binding a DNA fragment containing the predicted DdrI binding consensus. (A) The sequence logo of the putative DdrI binding site was deduced from the second round of DdrI target predictions by using a matrix based on the 115 potential DdrI binding sites found in the *D. radiodurans* genome (Table S2). (B) Electrophoretic mobility shift assays performed with an 80-bp DNA fragment containing the predicted DdrI binding site and the recombinant His₆::DdrI protein (0.5 or 1 μM), in presence (+) or absence (-) of cAMP (200 μM). (C) DdrI protein (3 μg) was incubated with 0.05% glutaraldehyde in the presence or absence of cAMP at a final concentration of 200 μM. After migration, the gel was stained with Coomassie blue. M, molecular mass marker.

proteins of the Nudix family were found to be induced by heat shock treatment. We found that *dr0001* (*dnaN*), *dr0004* (*mutT*), *dr0219* (*ddrF*), *dr1571*, *dr1572* (*uvrD₂*), *dr1913* (*gyrA*), *dr1974* (*lon1*), *dr2381*, *drA0319*, and *drA0369* genes were induced by heat shock treatment in a DdrI-dependent manner (Fig. 5 and Table 1), suggesting that they may be direct targets of the DdrI regulatory protein (Tables S1 and S2). The *dr0219* coding sequence, not annotated by Hua and Hua (33), was found 43 bp downstream of a putative DdrI binding site (5'-TGTTATGTTATATACG-3') identified by FITBAR when the

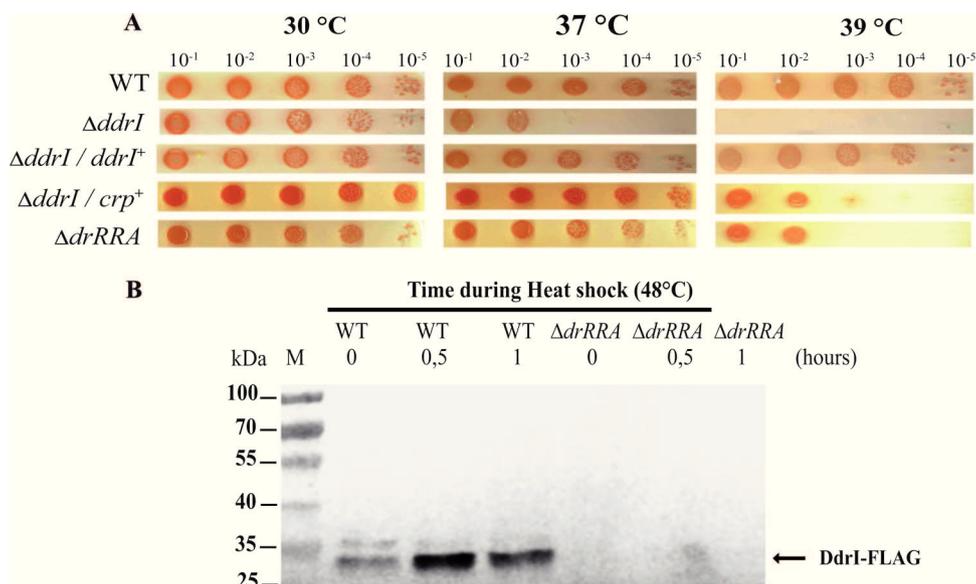


FIG 4 The $\Delta ddrI$ mutant exhibits a highly temperature-sensitive phenotype and induction of DdrI in response to heat shock that is dependent on the response regulator DrRRA. (A) Serial dilutions of GY9613 (wild type), GY13630 ($\Delta ddrI$ mutant), GY13643 ($\Delta ddrI/ddrI^+$ complemented strain), GY13644 ($\Delta ddrI/crp^+$ mutant), and GY13681 ($\Delta drRRA$ mutant) bacteria were spotted on TGY agar plates, and the plates were incubated at 30°C, 37°C, or 39°C for 3 to 5 days. (B) Exponential-phase cultures (A_{650} 0.45) of GY13663 ($drRRA^+ ddrI$ -FLAG mutant) and GY13679 ($\Delta drRRA ddrI$ -FLAG mutant) bacteria grown at 30°C were transferred to 48°C for 0.5 or 1 h before Western blot analysis with anti-FLAG antibodies of their protein extracts (10 μ g). Time zero corresponds to protein extracts prepared just before transfer to 48°C.

search was performed on the genome sequence published by White et al. (36). In contrast, the *drA0143* gene predicted to be a DdrI target (Tables S1 and S2) was highly induced by heat shock treatment, but in a DdrI-independent manner (Fig. 5). However, in the $\Delta ddrI$ mutant, the *drA0143* gene was 2.5-fold less expressed than in the wild-type strain at 30°C and after heat shock. We did not observe any induction of *dr0950* and *dr0980* after heat shock treatment.

We also tested the expression of a panel of 6 genes (*dr0997* [*ddrI*], *dr0349* [*lon2*], *dr0561*, *dr1046* [*clpB*], and *dr1082* [*lrpA*, also called *hpf* or *raiA*], and *drA0199*) previously shown to be induced by heat shock a minimum of 5-fold in *D. radiodurans* (34), described as being not controlled by both Sig1 (an alternative sigma factor) and HspR (a negative regulator of the heat shock response) proteins (34, 35), and not found in Tables S1 and S2. As a control, we analyzed the expression of the *groEL* gene (*dr0607*), which is known to be induced by heat shock under the control of Sig1 and HspR (34, 35) and is not found in the list of putative genes controlled by DdrI (Tables S1 and S2). We found that *groEL* was induced by 3.5-fold after 5 min of incubation at 48°C, but in a DdrI-independent manner. We confirmed the upregulation of the *ddrI* gene after 5 min of incubation at 48°C (Fig. 5) (34), and we showed that *drA0199* was induced independently of the DdrI protein, whereas *dr0349*, *dr0561*, *dr1046*, and *dr1082* were induced by heat shock treatment in a DdrI-dependent manner (Fig. 5 and Table 1). The expression of these 4 genes may be indirectly regulated by the DdrI protein. The *dr0178* gene, belonging to a transposable element of the IS200/IS605 family, was also reported to be upregulated 5.9-fold after heat shock treatment (34). As previously shown, the standard R1 ATCC 13939 strain used in our study only contains one active copy of an IS200/IS605 family member, called ISDra2F, while the second copy is inactive (37). This is in contrast with the first published complete genome sequence of *D. radiodurans* (36), in which 7 complete ISDra2 copies and one partial ISDra2 copy were reported (38). The gene corresponding to *dr0178* in ISDra2F is *dr1651* (*tnpB*) (39, 40). Thus, we tested, by RT-qPCR, the effect of DdrI deficiency on heat shock induction of both *dr1651* (*tnpB*)

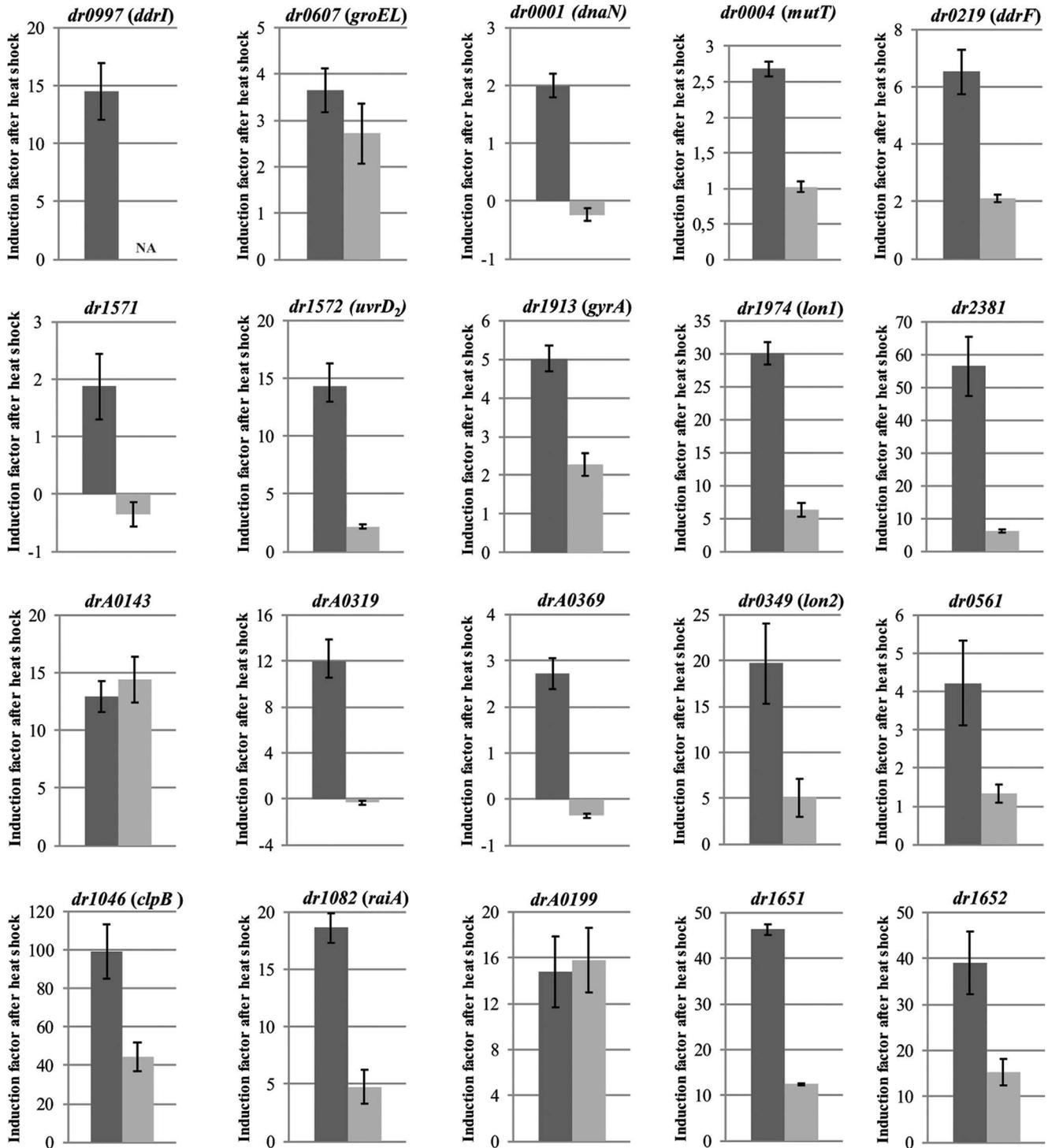


FIG 5 DdrI is important for transcriptional heat shock induction of several genes. GY9613 (wild type, dark-gray bars) and GY13630 (Δ ddl mutant, light-gray bars) strains were grown to A_{650} of 0.5 at 30°C and transferred or not transferred to 48°C for 5 min before extraction of total RNA. Expression values at 48°C relative to 30°C were determined and were normalized to the expression values of reference genes *tuf1* (*dr0309*) and *recN* (*dr1477*), as described in Materials and Methods. Error bars represent the standard deviations of the results from triplicate qRT-PCRs from three or four biological replicates.

and *dr1652* (*tnpA*) genes belonging to the same operon and encoding a negative regulator of IS*Dra2* transposition and the IS*Dra2* transposase, respectively. We found that both IS*Dra2* genes were highly induced by heat shock treatment and that this induction required DdrI (Fig. 5).

TABLE 1 Main putative DdrI targets, sorted by their function in DNA metabolism or stress responses^a

Functional group and gene identified by Hua and Hua (33)	Gene identified by White et al. (36)	Function	FITBAR CRP ^b	FITBAR DdrI ^c	Heat shock ^d
Replication, recombination, and repair					
A2G07_00390	DR0001	DnaN, DNA polymerase III beta-subunit	X	X	X
A2G07_00380	—	DdrC, DNA damage response protein	X	X	
A2G07_00375	DR0004	MutT, Nudix family protein	X	X	X
A2G07_00040	DR0070	DdrB, DNA damage response protein	X	X	
A2G07_13010	DR0100	SSB, single-stranded DNA-binding protein	X	X	
—	DR0219	DdrF, DNA damage response protein			X
A2G07_11420	DR0423	DdrA, DNA damage response protein	X	X	
A2G07_05720	DR1572	UvrD ₂ , DNA helicase	X	X	X
A2G07_04095	DR1902	RecD, exodeoxyribonuclease V subunit	X		
A2G07_04045	DR1913	GyrA, DNA gyrase subunit A	X	X	X
A2G07_13525	DRA0001	ParA, chromosome-partitioning protein	X	X	
Stress response and chaperones					
A2G07_11785	DR0349	Lon2, ATP-dependent protease			X
A2G07_10695	DR0561	Periplasmic maltose-binding protein			X
A2G07_09290	DR0844	Thioredoxin domain-containing protein	X		
A2G07_08295	DR1046	ClpB, ATP-dependent protease			X
A2G07_08110	DR1082	RaiA, ribosome-associated translation inhibitor			X
A2G07_06675	DR1372	Water stress, hypersensitive response domain-containing protein	X	X	
A2G07_05840	DR1546	SodC, superoxide dismutase	X	X	
A2G07_05725	DR1571	Peptide ABC transporter	X	X	X
A2G07_03765	DR1974	Lon1, ATP-dependent protease	X		X
A2G07_01670	DR2381	Aldehyde dehydrogenase/enoyl-CoA hydratase	X	X	X
A2G07_14210	DRA0146	Catalase	X	X	
A2G07_14755	DRA0259	KatE2, catalase	X		
A2G07_13265	DRA0319	Urease beta/gamma-subunit	X	X	X
A2G07_13520	DRA0369	Hypothetical protein	X	X	X
Regulation of transcription and signal transduction mechanisms					
A2G07_09790	DR0743	DNA-binding response regulator	X	X	
A2G07_09785	DR0744	Two-component sensor histidine kinase	X		
A2G07_04605	DR1797	Transcription termination/antitermination protein NusA	X	X	
A2G07_04050	DR1912	Protein tyrosine phosphatase	X	X	
A2G07_00810	DR2556	Response regulator		X	
A2G07_00435	DR2629	PadR family transcriptional regulator	X	X	
A2G07_13430	DRA0350	Histidine kinase	X		
A2G07_15105	DRB0044	Diguanylate cyclase	X	X	

^a—, not correctly annotated.^bGenes proposed by FITBAR to be regulated by DdrI using as a matrix the 166 CRP binding sites identified in the *E. coli* genome (Table S1).^cGenes proposed by FITBAR to be regulated by DdrI using as a matrix the 176 putative DdrI binding sites identified in the *D. radiodurans* genome (Table S2).^dGenes induced by heat shock treatment in a DdrI-dependent manner (Fig. 5).

Taken together, these results confirm the direct or indirect DdrI-dependent regulation of several key components of the heat shock regulon, in agreement with the thermosensitive phenotype of the Δ *ddrI* mutant.

DdrI is involved in completion of cell division, genome segregation, and stability of the MP1 megaplasmid in *D. radiodurans*. *D. radiodurans* cells depleted for DdrI were analyzed by fluorescence microscopy at three different growth states, exponential (A_{650} , 0.3), transitional (A_{650} , 1.5), and stationary (A_{650} , 3.5) phases. The absence of the DdrI protein in exponentially growing *D. radiodurans* cells led to 55.2% (544/986) of the cells belonging to tetrads versus 34.5% (252/730) for the R1 strain (Fig. 6 and S5). Surprisingly, in the absence of DdrI, structures containing 8 cells (two-tetrads), representing 2.4% of the exponentially growing cells (24/986), were observed,

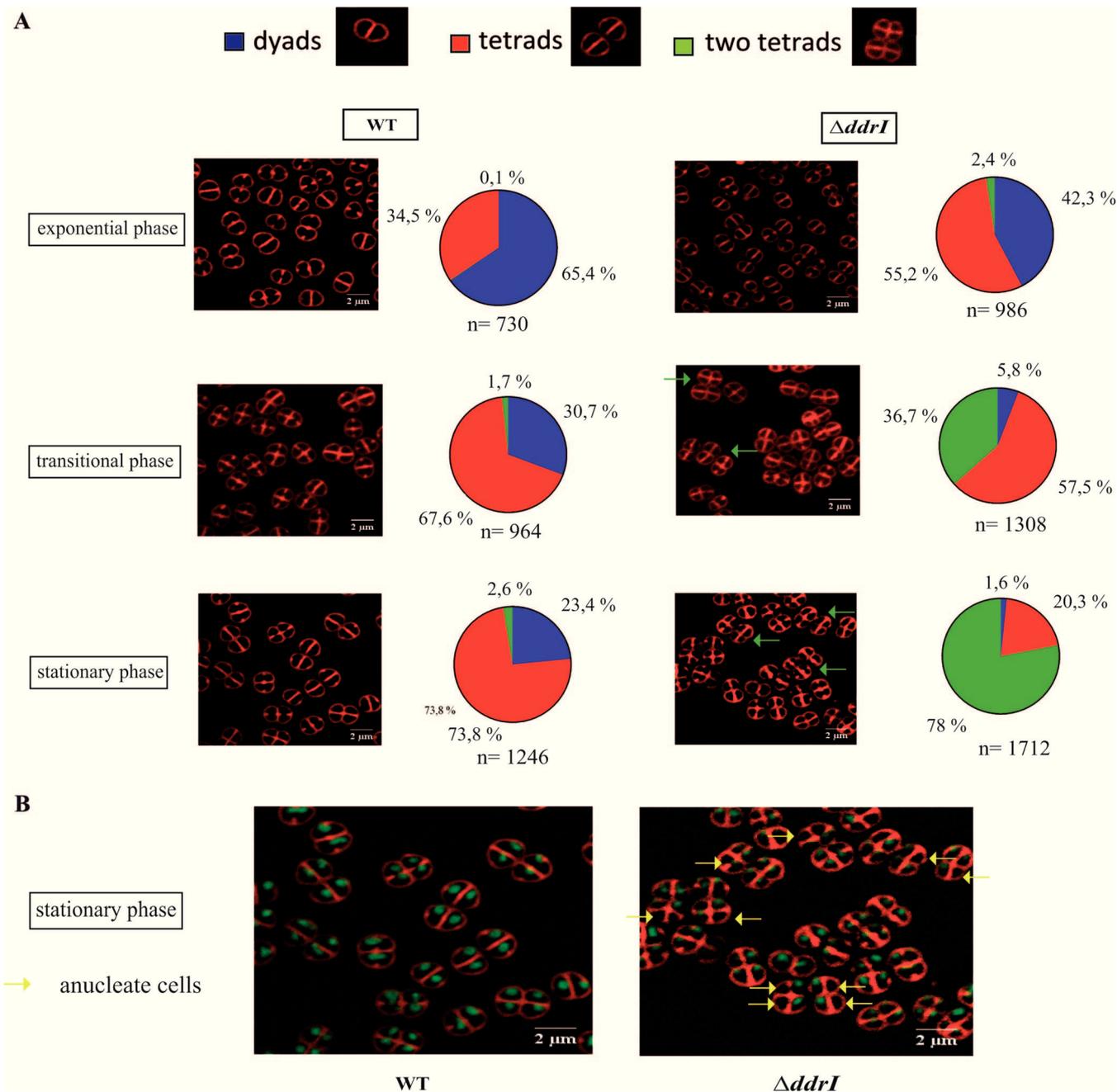


FIG 6 *DdrI* is required for the regulation of cell division and/or genomic DNA segregation. (A) Fluorescence microscopy analyses of the cell shape of exponential (A_{650} 0.3), transitional (A_{650} 1.5) and stationary (A_{650} 3.5) phase cells from GY9613 (wild type) and GY13630 ($\Delta ddrI$ mutant) strains. The percentage of cells found in dyads (2 cells, blue), tetrads (4 cells, red) and two-tetrads (8 cells, green) are illustrated in the pie charts. Two-tetrads are indicated by green arrows. (B) Membranes were stained with FM4-64 (red) and nucleoids with DAPI (green). Anucleate cells are indicated by yellow arrows. *n* represents the total number of cells examined.

and their proportion increased dramatically at transitional- and stationary-growth phases to reach 36.7% (480/1,308) and 78.0% (1,336/1,712) of the cells, respectively. In contrast, the proportion of wild-type cells belonging to the two-tetrads was very low, these structures being undetectable during exponential growth, and only 2.6% (32/1,246) of them were present at stationary phase. Moreover, the proportion of $\Delta ddrI$ mutant cells belonging to dyads decreased rapidly during the cell cycle and dropped to 1.6% (28/1,712) at stationary phase (Fig. 6 and S5). These results suggest a putative role of the *DdrI* protein in the completion of *D. radiodurans* cell division.

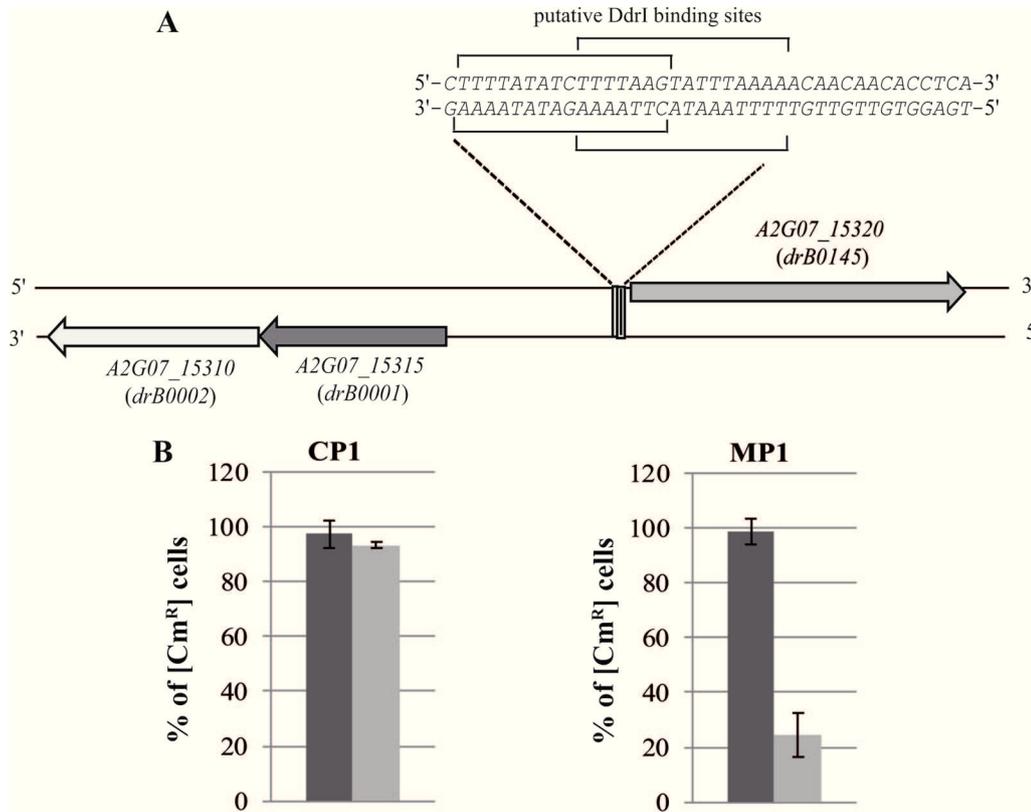


FIG 7 The absence of the DdrI protein reduces the maintenance of the MP1 megaplasmid in *D. radiodurans*. (A) Putative DdrI binding sites located upstream of genes related to DNA replication and segregation of the MP1 megaplasmid are indicated. The DdrI binding sites potentially involved in transcriptional regulation of *drB0145* gene and of the divergently transcribed *drB0001-drB0002* operon are indicated by brackets. (B) Aliquots of GY13673 (*ddrI*⁺ Δ *drC0017* Ω *cat*), GY13674 (Δ *ddrI* Δ *drC0017* Ω *cat*), GY13696 (*ddrI*⁺ Δ *drB0121* Ω *cat*), and GY13697 (Δ *ddrI* Δ *drB0121* Ω *cat*) cells containing either CP1 Ω *cat* (left) or MP1 Ω *cat* (right) were grown for 10 generations in TGY2X liquid medium without selection pressure (see Materials and Methods). Appropriate dilutions were then plated on both TGY agar and TGY agar plates supplemented with chloramphenicol to determine the proportions of cells harboring either MP1 Ω *cat* or CP1 Ω *cat*. The proportions of chloramphenicol-resistant cells are the averages of the results from at least three independent experiments.

Interestingly, during exponential growth, 7.6% (15/197) of Δ *ddrI* mutant cells were found to be anucleated, compared to <0.5% (<1/202) for the R1 wild-type cells. This phenotype was even more pronounced during the transitional- and stationary-growth phases, where 15.4% (32/208) and 25% (53/212) of the Δ *ddrI* anucleate cells were observed, compared to <0.5% (<1/210) and 4% (8/201) for the R1 wild-type cells, respectively. These results suggest that DdrI may also be implicated in the regulation of genes involved in chromosome segregation. The *drB0145* gene encoding a putative plasmid replication initiator protein and the divergently transcribed operon encompassing the *drB0001* and *drB0002* genes annotated as encoding a ParA ATPase involved in chromosome partitioning and a protein of the ParB family, respectively, share two putative overlapping DdrI binding motifs (Fig. 7A and Tables S1 and S2). To compare the maintenance of the MP1 megaplasmid harboring these genes in wild-type and Δ *ddrI* mutant cells, we introduced a cassette expressing resistance to chloramphenicol into the *drB0121* gene located on the MP1 replicon and previously shown to be inactivated without any effect on growth (13). We found that the proportion of chloramphenicol-resistant (Cm^r) cells containing the MP1 megaplasmid diminished to 24% after 10 generations in the Δ *ddrI* mutant when cells are grown without selection pressure, whereas the megaplasmid was stably maintained in wild-type cells (Fig. 7B). In contrast, when the Cm^r cassette was introduced into the *drC0017* gene of the CP1 plasmid, the proportion of Cm^r cells after 10 generations did not decrease (Fig. 7B). These results indicate that DdrI participates in the maintenance of the MP1 megaplasmid.

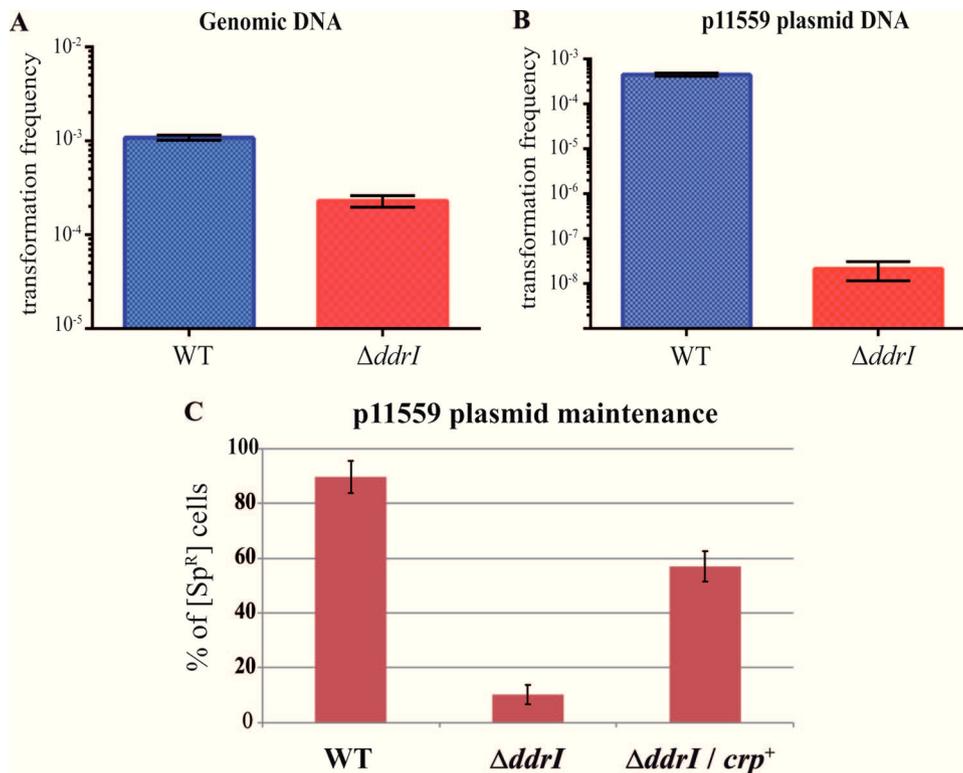


FIG 8 Deletion of *ddlI* dramatically reduces p11559 plasmid transformation frequency in *D. radiodurans*. (A and B) GY9613 (wild type) and GY13630 ($\Delta ddlI$ mutant) competent cells were transformed with 300 ng of genomic DNA from the GY11733 strain (conferring rifampin resistance) (A) or 300 ng of p11559 plasmid DNA (conferring spectinomycin resistance) (B). Appropriate dilutions of the transformation mixtures were plated on TGY agar plates to determine the number of viable cells, and on TGY agar plates supplemented with rifampin or spectinomycin to determine the number of transformants. The transformation frequencies were calculated as the number of transformants divided by the number of viable cells in the transformation mixture. The values are the averages of the results from at least three independent experiments. (C) Aliquots of GY14142 (*ddlI*⁺), GY13670 ($\Delta ddlI$) and GY13644 ($\Delta ddlI crp^+$) cells harboring the p11559 plasmid were grown for 10 generations in TGY2X liquid medium without selection pressure. Then, appropriate dilutions were spread on both TGY agar and TGY agar plates supplemented with spectinomycin to calculate the proportions of spectinomycin-resistant cells harboring p11559. The values are the averages of the results from at least three independent experiments.

All the morphological defects observed in cells devoid of DdrI were increased in stationary phase. Thus, we analyzed by Western blotting the expression of the DdrI-FLAG protein in exponential, transitional, and stationary phases of growth, and we showed that the expression of DdrI was highly induced at stationary phase in a DrRRA-dependent manner (Fig. S6), suggesting an important role of DdrI at this growth phase.

DdrI is required for plasmid p11559 maintenance in *D. radiodurans*. During our strain constructions, we observed that transformation was less efficient in $\Delta ddlI$ mutant bacteria. Thus, we analyzed the effect of the absence of DdrI protein on DNA transformation in *D. radiodurans*. As shown in Fig. 8A, the deletion of *ddlI* moderately decreased chromosomal DNA transformation frequency (approximately 5-fold) but dramatically affected the plasmid DNA transformation efficiency. Indeed, the transformation frequency of the p11559 plasmid (41), conferring spectinomycin resistance, dropped 20,000-fold in cells devoid of DdrI compared to wild-type cells (Fig. 8B). These observations suggest the requirement of DdrI for efficient overall DNA transformation or for replication and/or maintenance of plasmid p11559 in *D. radiodurans*.

During the natural DNA transformation process in *D. radiodurans*, only one strand of incoming DNA is transported into the cytoplasm. Bouthier de la Tour et al. (7) previously demonstrated that the reconstitution of an intact plasmid by single-strand annealing (SSA) requires the DdrB protein, likely through its single-strand annealing activity. To

test whether DdrI regulates *ddrB* gene expression, we analyzed, by Western blotting, the cellular level of DdrB-FLAG-tagged protein expressed in R1 strain and in the $\Delta ddrI$ mutant. As shown in Fig. S7A, the absence of DdrI protein results in a significant increase in the DdrB-FLAG protein level. This result suggests that DdrI negatively regulates the expression of *ddrB*, in accordance with the location of its putative binding site downstream of the *ddrB* promoter and overlapping the RDRM recognized by the DdrO repressor (Fig. S7B) (18). Therefore, the strong reduction in plasmid DNA transformation efficiency in the $\Delta ddrI$ mutant may be related to a defect in stable plasmid maintenance rather than impairment of the SSA process. To test this hypothesis, we analyzed the maintenance of the p11559 plasmid in the $\Delta ddrI$ mutant (p11559) and R1 (p11559) strains grown for 10 generations without selection pressure. As shown in Fig. 8C, the spectinomycin-resistant (*Spc^r*) population of cells harboring plasmid p11559 diminished from 89.7% in the wild-type strain to approximately 10% in the $\Delta ddrI$ mutant after 10 generations. Interestingly, the induced plasmid-based production of *E. coli* CRP in the $\Delta ddrI$ mutant bacteria resulted in an intermediate 57% proportion of *Spc^r* cells after growth without any selection pressure for 10 generations. These results suggest that some putative DdrI target sites, located on plasmid p11559 or on the whole genome of *D. radiodurans*, may be involved in stable maintenance of plasmid p11559 and are shared with the *E. coli* CRP.

DISCUSSION

To date, approximately 100 genes have been annotated as encoding transcriptional regulators and transcription factors in the *D. radiodurans* genome, but only a few of them have been functionally studied. Cells devoid of the DdrI protein, a transcription regulator of the CRP family, display a pleiotropic phenotype including growth defects under laboratory standard conditions, sensitivity to genotoxic agents, oxidative stress (13, 26; this work), heat shock treatment, as well as defects in cell division and replicon stability.

We showed here that the expression of *E. coli* CRP (CRP_{Ec}) in a *D. radiodurans* $\Delta ddrI$ mutant partially restores growth and resistance to UVC, MMC, Paraquat, and heat shock, strongly suggesting that DdrI is a protein belonging to the CRP family, and that both the CRP_{Ec} and DdrI regulators can share the regulation of several common target genes. In agreement with this, the alignment of DNA-binding sites previously identified for several members of the CRP family revealed a consensus sequence among diverse bacterial species (see Fig. S2 in the supplemental material). These data led us to perform an *in silico* prediction of the potential DdrI targets in the *D. radiodurans* genome, using the FITBAR Web tool (31). A pseudopalindromic 5'-TGTGA(N₆)TCACA-3' consensus sequence was extrapolated from the 115 DdrI candidate target genes identified (Table S2 and Fig. 3A). This motif is in agreement with binding sites of the HTH regulator family members, which bind to DNA as dimers. EMSAs showed the important role played by cAMP for DNA binding on a DNA sequence containing this site (Fig. 3). These results suggest that DdrI likely undergoes a conformational change upon cAMP binding necessary for its DNA binding, as previously shown for *E. coli* CRP (42–44) and other CRP family members (45, 46), contrary to the SdrP factor of *Thermus thermophilus*, which acts independently of any added effector molecule (47). Although adenylate cyclases lack a specific signature, making them difficult to predict (48), DRA0006 was proposed to contain domains that are similar to those of adenylate cyclases (26). Moreover, *D. radiodurans* encodes several putative cAMP-binding proteins, and its cAMP intracellular concentration was shown to increase following gamma irradiation (49), suggesting a potential function of cAMP as a second messenger in *D. radiodurans*.

The 115 *in silico*-predicted DdrI target genes are involved in various cellular processes, including replication and DNA repair, response to oxidative stress and heat shock treatment, and signal transduction (Table 1), and several genes are similar to known CRP_{Ec} targets (particularly those involved in central carbon metabolism, transport of various metabolites, cell wall biogenesis, and lipid metabolism) (Table S2).

Surprisingly, several putative DdrI binding sites are distant from the beginning of the coding sequences (>250 bp). However, we showed that *dr2381* is strongly upregulated (56-fold) after heat shock treatment in a DdrI-dependent manner (Fig. 5), in spite of the distance of the putative DdrI binding site (604 bp) (Tables S1 and S2).

To better understand the sensitivity of the Δ *ddrI* mutant to heat shock treatment, we tested, by RT-qPCR, the expression levels of heat shock responsive genes. Here, we showed that *ddrI* was induced by heat shock treatment and that the expression of the DdrI protein was under the control of DrRRA, even under normal growth conditions. This control is direct since the DrRRA regulator binds to the promoter region of the *ddrI* gene (25). We thus propose that the heat shock stimulus activates a two-component system consisting of a not-yet-identified histidine kinase and its cognate response regulator DrRRA (25), which in turn induces the transcription of *ddrI*. After 5 min at 48°C, all the genes tested were upregulated in a DdrI-dependent manner except the *drA0199* gene, encoding a nodulation-related protein, and *drA0143*, encoding a 3-hydroxyacyl-coenzyme A (3-hydroxyacyl-CoA) dehydrogenase (Fig. 5). A direct DdrI control is expected for the genes exhibiting a predicted DdrI binding site in their upstream regulatory region (Tables S1 and S2), in contrast to the other genes tested, for which DdrI may act indirectly. However, the *in silico* prediction may not identify targets with less homology to the consensus sequence, and additional targets may exist *in vivo*, as suggested by the binding of DdrI shown by EMSAs, to sequences located upstream of different genes not found in Tables S1 and S2 (26). Among these sequences, some are located upstream of *dr0997* (*ddrI*), *dr1689* (*glgC*), *dr1819* (*uvsE*), *dr1921* (*sbcD*), and *dr2220* (*terB*) but contain 7-bp spacers and not 6 bp for CRP_{Ec} and the CRP from other bacterial species (Fig. S2). However, it is important to note that CRP and related regulators are able to recognize and bind to relatively divergent sites, which are reflected in the very low informational content of their consensus sequence, and in *E. coli*, genomic SELEX experiments also identified new CRP binding sites not predicted *in silico* (27).

We also showed that DdrI is involved in the upregulation of *tnpA* and *tnpB*, the two genes of the *ISDra2F* transposon, in response to heat shock treatment, presumably indirectly, since no predicted DdrI target sequence was found in *ISDra2*. The subterminal stem-loop necessary for *ISDra2* transposition (40) has been shown to act as a transcription terminator, avoiding any transcription readthrough in the IS. We previously showed that *ISDra2F* transposition is increased after exposure to ionizing radiation (37, 40) but did not result from an increase in TnpA expression during the 180-min postirradiation incubation (40). The consequences of the increased expression of the TnpA transposase and the TnpB negative regulator of transposition upon heat shock treatment, in the presence of DdrI, and to a lower extent in the absence of DdrI (Fig. 5), require further investigations.

We further showed that DdrI was induced in the stationary phase of growth in a DrRRA-dependent manner and that DdrI deficiency leads to a striking increase in two-tetrad-forming cell subpopulations during the cell cycle, compared to the wild-type strain, indicating that DdrI is important for the accurate completion of cell division, particularly during the stationary phase. Chou and Tan (50) previously showed that the addition of NaCl could induce 8-, 16-, and 32-cell unit formation and attributed this phenomenon to the failure of cells to septate after cell wall formation. Once a tetrad forms during active growth, adjacent pairs seem to separate by delamination. Thus, the DdrI protein might regulate some genes involved in this delamination process. DdrI deficiency also leads to a striking increase in anucleate cells during the cell cycle, compared to the wild-type strain, indicating that DdrI is important for genome segregation. The Par system has been shown in *Caulobacter crescentus* and *Bacillus subtilis* to be required for active chromosome segregation by assisting segregation of the replication origin (for a review, see references 51 and 52). In *D. radiodurans*, each genome replicon, except the CP1 plasmid, has its own Par proteins encoded by *parAB* operons. The deletion of *parB1* from chromosome I resulted in a significantly higher level of anucleation than that measured in the wild type (53), a phenotype similar to that observed for the Δ *ddrI* mutant. In addition, functional characterization of the partition-

ing proteins of *D. radiodurans* suggested the possibility of a role of ParA2, encoded on chromosome II, in the regulation of cell division by nucleoid compaction at the vicinity of septum growth (54), and it was proposed that interaction of Par proteins with divisome proteins may play important roles in genome segregation (55). A predicted DdrI target sequence was found 545 bp upstream of the promoter region of the *drA0001-drA0002* operon encoding the ParA₂ and ParB₂ chromosome-partitioning proteins (Tables S1 and S2), suggesting that the high anucleation levels observed in the $\Delta ddrI$ mutant may be partly related to a defect in completion of chromosome segregation due to downregulation of the *parA₂B₂* operon. In *D. radiodurans* lacking topoisomerase IV (Topo IV), its DNA gyrase (encoded by *gyrA* and *gyrB*) is expected to ensure the Topo IV-mediated functions in chromosome segregation, namely, the decatenase function required for partitioning the daughter chromosomes before cell division (56). The *gyrA* gene was shown to contain a putative DdrI binding site 112 bp upstream of its coding region (Tables S1 and S2) and to be upregulated in a DdrI-dependent manner upon heat shock treatment (Fig. 5). Therefore, the lack of DdrI may also impair GyrA expression and thus accurate chromosome segregation.

We demonstrated that DdrI is required for stable maintenance of the natural MP1 megaplasmid. Two putative DdrI binding sites were identified upstream of the promoter region of *drB0145* (encoding a plasmid replication initiator protein) and the divergently transcribed operon encompassing the *drB0001* and *drB0002* genes encoding ParA₃ and ParB₃, respectively (Fig. 7). Therefore, the involvement of DdrI in the stable maintenance of MP1 may be mediated through its positive control of both *drB0145* and *parA3B3* operon expression, as suggested above for the *parA2B2* operon expressed by chromosome II. Unfortunately, as chromosome II expresses essential genes, it was not possible to analyze the effect of DdrI deficiency on its maintenance. In addition, DdrI was shown to be required for stable maintenance of the p11559 plasmid (Fig. 8) but not for those of the natural CP1 plasmid. The reduction in p11559 stability may explain the partial complementation of the $\Delta ddrI$ mutant by CRP_{Ec} expressed from this plasmid, even if the experiments were performed under constant selection pressure. The p11559 plasmid (41) contains the basic replicon of the deinococcal SARK plasmid pUE10 (57), which is different from those of CP1, and both plasmids likely employ different mechanisms for their own replication, explaining their different stabilities in the absence of DdrI.

In conclusion, we propose that DdrI may regulate, directly or indirectly, a large variety of genes involved in DNA metabolism, DNA repair, response to oxidative stress or to heat shock, regulation of transcription, and signal transduction (Table 1), as well as many genes involved in ribosome structure and translation and in various metabolic pathways (Tables S1 and S2). We also showed that this regulator may be involved in cell division, chromosome segregation, and plasmid stability. The *ddrI* gene transcription levels are under the control of the DrRRA response regulator, but DdrI itself putatively regulates the expression of other regulators (Tables 1, S1, and S2). Our results indicate that DdrI is a major regulator in *D. radiodurans*, and further studies will better explain the cascade of regulatory pathways associated with the various phenotypes observed for a $\Delta ddrI$ mutant.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, media, and growth conditions. The bacterial strains used are listed in Table 2. *E. coli* strain DH5 α was the general cloning host, and strain SCS110 was used to propagate plasmids prior to their introduction into *D. radiodurans* via transformation (58). All *D. radiodurans* strains were derivatives of strain R1 ATCC 13939 and were grown at 30°C in TGY2X liquid medium or tryptone-glucose-yeast extract (TGY) plates (15). *E. coli* strains were grown at 37°C in lysogeny broth (LB). Media were supplemented with the appropriate antibiotics used at the following concentrations: 75 μ g/ml spectinomycin, 100 μ g/ml hygromycin, 6 μ g/ml kanamycin, 3.5 μ g/ml chloramphenicol, and 25 μ g/ml rifampin for *D. radiodurans* and 50 μ g/ml spectinomycin, 25 μ g/ml kanamycin, and 35 μ g/ml chloramphenicol for *E. coli*. The expression of *E. coli* CRP in *D. radiodurans* or His₆::DdrI in Rosetta (DE3) was induced by adding 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) to the medium. The transformation of *D. radiodurans* with genomic DNA, PCR products, or plasmid DNA was performed as previously described (15).

TABLE 2 Bacterial strains and plasmids used

Strain or plasmid	Genotype or other relevant characteristics	Source or reference
Strains		
<i>E. coli</i>		
MG1655	K-12 F ⁻ λ ⁻ <i>ilvG rfb-50 rph-1</i>	Laboratory stock
DH5α	<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 lacI^qZΔM15)</i>	Laboratory stock
Rosetta (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS20 gal dcm lacY1</i> (DE3)/pRARE ⁶ (Cm ^r)	
<i>D. radiodurans</i>		
GY9613	ATCC 13939, R1	64
GY11733	Rif ^r (<i>rpoBΔ9 Rif^r</i>) ^a	41
GY12830	<i>ddrB::spa-cat</i>	7
GY13109	Δ(<i>ISDra2F</i>)Ω <i>tetA</i>	40
GY13630	Δ <i>ddrI</i> Ω <i>hph</i>	This work
GY13641	Δ <i>ddrI</i> Ω <i>hph</i> Δ(<i>ISDra2F</i>)Ω <i>tetA</i>	This work
GY13643	Δ <i>ddrI</i> Ω <i>hph</i> Δ(<i>ISDra2F</i>)Ω <i>tetA</i> Ω <i>P_{ddrI}::ddrI-cat</i>	This work
GY13644	Δ <i>ddrI</i> Ω <i>hph</i> /p14750	This work
GY13645	Δ <i>ddrI</i> Ω <i>P_{ddrI}::his6::ddrI-kan</i>	This work
GY13653	Δ <i>ddrI</i> Ω <i>hph ddrB::spa-cat</i>	This work
GY13663	<i>ddrI::flag-cat</i>	This work
GY13670	Δ <i>ddrI</i> Ω <i>hph</i> /p11559	This work
GY13673	Δ <i>drC0017</i> Ω <i>cat</i>	This work
GY13674	Δ <i>ddrI</i> Ω <i>hph</i> Δ <i>drC0017</i> Ω <i>cat</i>	This work
GY13679	Δ <i>drRRA</i> Ω <i>hph ddrI::flag-cat</i>	This work
GY13681	Δ <i>drRRA</i> Ω <i>hph</i>	This work
GY13696	Δ <i>drB0121</i> Ω <i>cat</i>	This work
GY13697	Δ <i>ddrI</i> Ω <i>hph</i> Δ <i>drB0121</i> Ω <i>cat</i>	This work
GY14142	R1/p11559	This work
Plasmids		
p11086	Source of P _{out} :: <i>kan</i> cassette	Laboratory stock
p11559	Expression vector; P _{spac} - <i>term116</i> , P _{tufA} :: <i>lacI</i> , Spc ^r in <i>E. coli</i> and <i>D. radiodurans</i>	41
p12625	Source of P _{kat} :: <i>hph</i> cassette	Laboratory stock
p12723	Source of <i>flag-cat</i> cassette	This work
p14738	pET28a; P _{T7lac} ::His ₆ :: <i>ddrI-termT7</i>	This work
p14750	p11559; P _{spac} :: <i>crp-term116</i>	This work
pP56	Source of P _{tufI} :: <i>cat</i> cassette	65
pET28a	pET expression system, P _{T7lac} N-terminal His ₆ tag	Novagen

^aRif^r, rifampin resistant.

Construction of *D. radiodurans* mutant and tester strains. GY13630 Δ*ddrI*, GY13681 Δ*drRRA*, GY13673 Δ*drC0017*, and GY13696 Δ*drB0121* mutant strains were constructed by replacement of the corresponding locus with the appropriate antibiotic resistance cassette using the tripartite ligation method (41). The GY13674 Δ*drC0017* Δ*ddrI* and GY13697 Δ*drB0121* Δ*ddrI* double-mutant strains were constructed by transforming the Δ*drC0017*Ω*cat* and Δ*drB0121*Ω*cat* single mutants, respectively, with genomic DNA from the GY13630 Δ*ddrI*Ω*hph* strain. The Δ*ddrI* mutant, expressing an ectopic *ddrI* gene under the control of its own promoter, was constructed by replacement of the *tetA* gene in the GY13641 Δ*ddrI*Ω*hph* Δ*ISDra2F*Ω*tetA* strain, with a fragment encompassing the P_{ddrI}*ddrI* and the Cm^r cassette. The *D. radiodurans* strain GY13663, expressing the DdrI protein fused to a FLAG tag at the C terminus (DdrI-FLAG), was constructed using the tripartite ligation method (41). The Δ*ddrI* mutant strain GY13653 expressing the DdrB-SPA protein and the Δ*drRRA* mutant strain GY13679 expressing the DdrI-FLAG protein were obtained by transforming the GY13630 Δ*ddrI* or the GY13681 Δ*drRRA* strain with genomic DNA from GY12830 and GY13663 expressing the appropriate tagged proteins, respectively. To assess the functionality of the His₆::DdrI-tagged protein, GY13645 expressing the His₆::DdrI-tagged protein was constructed by replacement of the *ddrI* locus with a fragment encompassing the *ddrI* coding sequence fused to a His₆ tag at the N terminus and the kanamycin resistance (Kan^r) cassette. The purity of the strains was systematically confirmed by diagnostic PCR and sequencing (see Fig. S8A and B for the genetic structure and the purity of the Δ*ddrI* mutant and Fig. S8C and D for those of Δ*drC0017*Ω*cat*, Δ*drC0017*Ω*cat* Δ*ddrI*, Δ*drB0121*Ω*cat*, and Δ*drB0121*Ω*cat* Δ*ddrI* mutants). The oligonucleotides used for strain construction and diagnostic PCR will be provided on request.

DNA manipulations. Plasmid DNA was extracted from *E. coli* using the NucleoSpin plasmid miniprep kit (Macherey-Nagel). *D. radiodurans* chromosomal DNA was isolated as described previously (59). PCRs were carried out with Phusion DNA polymerase (Thermo Scientific) to amplify fragments subsequently used for cloning, or with GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega) for diagnostic PCR. PCR products were purified using the PCR cleanup kit (Macherey-Nagel).

Plasmid construction. The *crp* coding sequence was amplified by PCR using genomic DNA from *E. coli* strain MG1655 as the template. The PCR fragment was digested by NdeI and XhoI and ligated into the expression vector p11559, resulting in plasmid p14750 expressing *crp* under the control of the P_{spac} promoter inducible by IPTG.

The *ddrI* coding sequence was amplified by PCR using genomic DNA of the wild-type GY9613 strain as the template. The PCR fragment was digested by *NdeI* and *XhoI* and ligated into the expression vector pET-28a (Novagen). The resulting p14738 plasmid expresses the DdrI protein fused to a His₆ tag at the N terminus under the control of the T7 *lac* promoter inducible by IPTG.

His₆::DdrI-tagged protein purification. The p14738 plasmid, expressing the His₆::DdrI-tagged protein under the control of the T7 *lac* promoter, was used to transform *E. coli* Rosetta (DE3) cells. Transformants were grown in LB medium supplemented with the appropriate antibiotics at 37°C to an A₆₀₀ of 0.45, and the expression of the His₆::DdrI protein was induced by IPTG at a final concentration of 1 mM for 3 h. Cells were harvested (3,500 × *g*, 10 min, 4°C), resuspended in lysis buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.8], 800 mM NaCl, 5% glycerol, 10 mM imidazole, 0.03% Triton X-100) at a rate of 0.1 ml of lysis buffer for A₆₀₀ of 1, and disrupted using an ultrasonic cell disrupter (350 W, 3 × 2 min). The cleared lysate was recovered by centrifugation (13,000 × *g*, 1 h, 4°C) and mixed gently overnight at 4°C with 1 ml nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) slurry equilibrated with lysis buffer (0.5 ml bed volume; Qiagen). The lysate-Ni-NTA mixture was then washed by 5 elution steps with 5 bed volumes of elution buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.8], 200 mM NaCl, 5% glycerol, and 0.03% Triton X-100) containing increasing concentrations of imidazole (40 mM, 60 mM, 100 mM, 150 mM, and 200 mM). The purity of the DdrI protein was verified by SDS-gel electrophoresis, and the protein fraction, eluted in the presence of 150 mM imidazole, was dialyzed on a PD10 column (GE Healthcare) with equilibration buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.8], 100 mM NaCl, and 30% glycerol), according to the manufacturer's protocol. Dithiothreitol (DTT) and EDTA were added at a final concentration of 1 mM, and the His₆::DdrI protein was stored at -80°C.

EMSA. A single-stranded Cy5-labeled oligonucleotide (10 μM), 5'-Cy5-CATCAGAAAATGTGTCTGG TGAAGCAGTTTTGTGAAAAAACTCACAGCCTGGGATAGAAAACAGCACTATCACAGCAT-3' (80 nt), containing a putative DdrI binding site (bold letters) at position 33, was incubated with the complementary single-stranded 80-nt oligonucleotide (10 μM) in 10 μl of annealing buffer (40 mM Tris-HCl [pH 7.8], 50 mM NaCl, 20 mM MgCl₂). The mixture was heated at 90°C for 10 min and cooled for 3 h at room temperature. Thirty femtomoles from the resulting double-stranded substrate was incubated for 20 min at 30°C with recombinant protein His₆::DdrI (0.5 or 1 μM) in 15 μl of binding buffer (10 mM Tris HCl [pH 7.8], 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mg/ml bovine serum albumin [BSA], 10% glycerol) in the presence or absence of 200 μM cAMP and poly(dI-dC) (13 or 33 μg/ml). The samples were loaded onto an 8% polyacrylamide (37.5/1 [wt/wt] acrylamide-bisacrylamide) gel in 0.25× Tris-borate-EDTA. After migration (20 V/cm, 3 h, 4°C), bands were visualized using a phosphorimager (Typhoon Trio imager; GE Healthcare).

Cross-linking of DdrI. Three micrograms of the DdrI protein was preincubated with 0 or 200 μM cAMP in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7) at 30°C for 20 min. Then, 0.05% glutaraldehyde was added or not added and the samples were incubated at 30°C for 30 min in a final volume of 20 μl. After incubation, 5 μl of 5× Laemmli buffer (312 mM Tris-HCl [pH 6.8], 50% glycerol, 250 mM DTT, 0.1% bromophenol blue) was added, and the samples were loaded onto a 15% SDS-polyacrylamide gel. After migration (14 V/cm, 2 h), the gel was stained using Coomassie blue.

Purification of total RNA and cDNA synthesis. Bacteria were grown to an A₆₅₀ of 0.5 at 30°C and transferred or not transferred to 48°C for 5 min. Then, bacteria (10 ml) were harvested and centrifuged (3,500 × *g*, 10 min at 4°C). The pellets were stored at -80°C for 2 h and total RNA were isolated using the FastRNA Pro Blue kit (MP Biomedicals, Irvine, CA) and the FastPrep-24 instrument, according to the manufacturer's protocols. The RNA concentration was measured using the DeNovix DS-11 spectrophotometer (SelectScience). One microgram of total RNA was then treated with DNase I amplification grade (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions, except that 1 μl of DNase I was added every 5 min during the 15-min incubation. RNA purity and integrity were analyzed by 1.4% agarose gel electrophoresis. Subsequently, 250 ng of RNA was then transcribed into cDNA by reverse transcriptase using the Maxima first-strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific), according to the manufacturer's instructions, in a final volume of 200 μl. The reverse transcriptase negative control, containing all reagents for the reverse transcription reaction except the Maxima enzyme mix, was carried out to assess, by quantitative PCR (qPCR) experiments, genomic DNA contamination of the RNA samples.

qPCR analyses. qPCR assays were performed using 2 μl of cDNA as the template and the iQaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad), according to the manufacturer's instructions. For all genes analyzed, the primer pairs were designed using the IDT PrimerQuest tool (Integrated DNA Technologies) and will be provided upon request. The thermal cycling protocol used on the Bio-Rad CFX 96 real-time PCR detection system was 1st step, 95°C for 2 min; 2nd step, 39 cycles of 95°C for 5 s and 60°C for 30 s; and 3rd step, melt curve from 60°C to 95°C, with an increment of 0.5°C for 5 s. The amplification specificities were verified by examining the melt curve profile, and the amplification efficiencies were assayed by generating standard curves (using serial dilutions of the cDNA). All genes tested exhibited the recommended amplification efficiency of 90 to 110% and R² values of >0.98. qPCR assays performed using the reverse transcriptase negative control as the template confirmed the absence of genomic DNA contamination (data not shown). Four candidate reference genes, *tuf1* (*dr0309*), *recN* (*dr1477*), *amyE* (*dr1472*), and *hpi* (*dr2508*), were evaluated for their expression stability on all samples by geNorm analysis (60) (qbase+). The *tuf1* (*dr0309*) and *recN* (*dr1477*) genes were validated as reference genes. Expression values in wild-type and Δ*ddrI* mutant (GY13630) bacteria after 5 min at 48°C relative to 30°C were determined for candidate genes and were normalized to the expression values of *tuf1* and *recN* using the REST 2009 software (<http://www.gene-quantification.de/rest-2009.html>). RT-qPCRs were performed in triplicate from three or four biological replicates.

Western blot analysis of tagged proteins DdrI-FLAG or DdrB-SPA. Exponential-growth cultures (A₆₅₀ 0.45) of bacteria expressing the DdrI-FLAG protein were grown at 30°C and then transferred to

48°C, 20-ml aliquots taken at different times (0, 0.5, or 1 h) were centrifuged ($3,500 \times g$, 10 min, 4°C). The pellets were resuspended in 150 μ l of $1 \times$ SSC buffer ($1 \times$ SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate), and protein extracts were prepared as previously described (61). Protein concentrations were determined by Bradford assay (Bio-Rad protein assay dye reagent), and 10 μ g of proteins was loaded on 12% SDS-PAGE gels (stain-free precast gels; Bio-Rad) and transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (GE Healthcare). The Western blot analyses were performed as previously described (18) with a 1:5,000 dilution of anti-FLAG rabbit primary antibodies (Thermo Scientific). For an analysis of expression of DdrB-SPA protein, 20 ml of exponential-growth cultures (A_{650} , 0.5) of GY12830 and GY13653 expressing the DdrB-SPA protein was prepared, and 5 μ g of proteins was analyzed by Western blot experiments with a 1:5,000 dilution of anti-FLAG rabbit primary antibodies (Thermo Scientific), as described above.

Sensitivity assays to DNA-damaging agents UVC and mitomycin C. Bacteria were grown in TGY2X liquid medium to an A_{650} of 1 and then serially diluted in TGY2X and spotted on TGY agar plates supplemented or not supplemented with mitomycin C (40 ng/ml), exposed or not exposed, to UVC rays (600 J/m²) at a dose rate of 3.5 J/m²/s. TGY agar plates were supplemented with spectinomycin and 1 mM IPTG for strains harboring the p14750 plasmid to induce *E. coli crp* gene expression.

Sensitivity assay to oxidative stress generated by Paraquat. *D. radiodurans* strains were analyzed for their sensitivity to Paraquat-methyl viologen (Sigma-Aldrich) by using the disc inhibition assay, as follows. Exponential-phase cultures (1.5 ml; A_{650} , 0.5) were spread onto TGY plates (supplemented with spectinomycin and 1 mM IPTG for strain GY13644). Sterilized 6-mm-diameter filter paper discs (Dominique Dutscher) were placed on the agar surface. Then, 10 μ l of various concentrations (4, 6, 8, and 10 mM) of Paraquat (freshly diluted in sterile H₂O) was spotted onto each disc. After incubation at 30°C for 2 days, the diameters of the growth inhibition zones were measured.

Sensitivity to heat shock. Overnight cultures of bacteria were grown at 30°C, serially diluted in TGY2X, spotted on TGY agar plates, and then incubated at 30°C, 37°C, or 39°C for 3 to 5 days.

Fluorescence microscopy. Cells in exponential-growth (A_{650} , 0.3), transitional-growth (A_{650} , 1.5), and stationary-growth (A_{650} , 3.5) phases were fixed by adding toluene (3% final concentration) and kept at 4°C overnight. DNA and membranes were stained by incubation with 2 μ g/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Invitrogen) and 6 μ g/ml FM4-64 (Life Technologies) for 5 min at room temperature. One microliter of the cell suspension (in 10 mM MgSO₄) was then immobilized onto 1% agarose-coated slides and observed by fluorescence microscopy on a wide-field Leica DM RXA microscope. Images were captured with a 5-MHz Micromax 1300Y charge-coupled-device (CCD) camera (Roper Instruments) with the appropriate filters and analyzed with the MetaMorph and ImageJ softwares.

In silico prediction of putative DdrI targets. The *in silico* prediction of potential DdrI targets in the *D. radiodurans* genome was performed using the Fast Investigation Tool for Bacterial and Archaeal Regulons (FITBAR) Web tool dedicated to statistically robust predictions of prokaryotic regulons (31). This analysis was performed on the sequenced *D. radiodurans* genome (33) by using the 166 binding sites recognized by the CRP of *E. coli* (27) as the matrix (see Table S1 in the supplemental material). A total of 478 putative DdrI binding sites were found in the *D. radiodurans* genome and sites located in intergenic regions at distances of <650 bp were listed (Table S1). The genome of *D. radiodurans* has a GC content of 67%, while that of *E. coli* is 50.8%. Thus, a matrix based on the set of 176 sequences among the potential DdrI intergenic targets was used in a second prediction to take this GC content discrepancy between *D. radiodurans* and *E. coli* into account and to increase the informational content of the consensus sequence; 269 sites were found in the *D. radiodurans* genome, with a majority (198 sites) located in intergenic regions, and sites located in intergenic regions at distances <650 bp were listed (Table S2). Position-specific scoring matrices (PSSM) were generated from the 166 CRP *E. coli* or the 176 putative DdrI binding sites (listed in Table S1) using log-odds PSSM (62). Chromosome scanning was concentrated on the intergenic regions, on both DNA strands, and false positives in the prediction were discerned by using compound importance sampling (CIS; described in reference 63) as a *P* value calculation algorithm. The list of putative DdrI binding sites (Tables S1 and S2) was sorted by position, and only predicted sites located from bp -650 to +3 of the downstream coding sequence were conserved.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/JB.00129-18>.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 9.6 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Adriana Bailone for valuable discussions and for her critical reading of the manuscript, Yvan Zivanovic for his constant help with *D. radiodurans* genome analysis, and Michael DuBow for polishing our English.

L.M. gratefully acknowledges the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI) for her doctoral training grant. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the University Paris-Sud, Electricité de France (RB2017-02 to F.C.) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR "Radioresistance"-11-BSV3-01701 to S.S.).

This work was carried out in compliance with the current laws governing genetic experimentation in France.

REFERENCES

- Confalonieri F, Sommer S. 2011. Bacterial and archaeal resistance to ionizing radiation. *J Phys* 261:012005. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/261/1/012005>.
- Slade D, Radman M. 2011. Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 75:133–191. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-10>.
- Krisko A, Radman M. 2013. Biology of extreme radiation resistance: the way of *Deinococcus radiodurans*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:a012765. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012765>.
- Timmins J, Moe E. 2016. A decade of biochemical and structural studies of the DNA repair machinery of *Deinococcus radiodurans*: major findings, functional and mechanistic insight and challenges. *Comput Struct Biotechnol J* 14:168–176. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.04.001>.
- Zahradka K, Slade D, Bailone A, Sommer S, Averbek D, Petranovic M, Lindner AB, Radman M. 2006. Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. *Nature* 443:569–573.
- Bentchikou E, Servant P, Coste G, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000774>.
- Bouthier de la Tour C, Boisnard S, Norais C, Touille M, Bentchikou E, Vannier F, Cox MM, Sommer S, 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. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.09.010>.
- Levin-Zaidman S, Englander J, Shimoni E, Sharma AK, Minton KW, Minsky A. 2003. Ringlike structure of the *Deinococcus radiodurans* genome: a key to radioresistance? *Science* 299:254–256. <https://doi.org/10.1126/science.1077865>.
- Zimmerman JM, Battista JR. 2005. A ring-like nucleoid is not necessary for radioresistance in the *Deinococcaceae*. *BMC Microbiol* 5:17. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-17>.
- Daly MJ. 2012. Death by protein damage in irradiated cells. *DNA Repair (Amst)* 11:12–21. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.10.024>.
- Ghosal D, Omelchenko MV, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Venkateswaran A, Zhai M, Kostandarithes HM, Brim H, Makarova KS, Wackett LP, Fredrickson JK, Daly MJ. 2005. How radiation kills cells: survival of *Deinococcus radiodurans* and *Shewanella oneidensis* under oxidative stress. *FEMS Microbiol Rev* 29:361–375. <https://doi.org/10.1016/j.fmre.2004.12.007>.
- Tanaka M, Earl AM, Howell HA, Park MJ, Eisen JA, Peterson SN, Battista JR. 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. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.029249>.
- Dulerio R, Onodera T, Coste G, Passot F, Dutertre M, Porteron M, Confalonieri F, Sommer S, Pasternak K. 2015. Identification of new genes contributing to the extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans* using a Tn5-based transposon mutant library. *PLoS One* 10:e0124358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124358>.
- Narumi I, Satoh K, Kikuchi M, Funayama T, Yanagisawa T, Kobayashi Y, Watanabe H, Yamamoto K. 2001. The LexA protein from *Deinococcus radiodurans* is not involved in RecA induction following gamma irradiation. *J Bacteriol* 183:6951–6956. <https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6951-6956.2001>.
- Bonacossa de Almeida C, Coste G, Sommer S, 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. <https://doi.org/10.1007/s00438-002-0718-x>.
- Satoh K, Ohba H, Sghaier H, Narumi I. 2006. Down-regulation of radioresistance by LexA2 in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology* 152:3217–3226. <https://doi.org/10.1099/mic.0.29139-0>.
- Ludanyi M, Blanchard L, Dulerio R, Brandelet G, Bellanger L, Pignol D, Lemaire D, de Groot A. 2014. Radiation response in *Deinococcus deserti*: IrrE is a metalloprotease that cleaves repressor protein DdrO. *Mol Microbiol* 94:434–449. <https://doi.org/10.1111/mmi.12774>.
- Devigne A, Ithurbide S, Bouthier de la Tour C, Passot F, Mathieu M, Sommer S, 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. <https://doi.org/10.1111/mmi.12991>.
- Wang Y, Xu Q, Lu H, Lin L, Wang L, Xu H, Cui X, Zhang H, Li T, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122071>.
- Makarova KS, Omelchenko MV, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Zhai M, Lapidus A, Copeland A, Kim E, Land M, Mavrommatis K, Pitluck S, Richardson PM, Detter C, Brettin T, Saunders E, Lai B, Ravel B, Kemner KM, Wolf YI, Sorokin A, Gerasimova AV, Gelfand MS, Fredrickson JK, Koonin EV, Daly MJ. 2007. *Deinococcus geothermalis*: the pool of extreme radiation resistance genes shrinks. *PLoS One* 2:e955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000955>.
- de Groot A, Dulerio R, Ortet P, Blanchard L, Guerin P, Fernandez B, Vacherie B, Dossat C, Jolivet E, Siguier P, Chandler M, Barakat M, Dedieu A, Barbe V, Heulin T, Sommer S, Achouak W, Armengaud J. 2009. Alliance of proteomics and genomics to unravel the specificities of Sahara bacterium *Deinococcus deserti*. *PLoS Genet* 5:e1000434. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000434>.
- Xu G, Lu H, Wang L, Chen H, Xu Z, Hu Y, Tian B, Hua Y. 2010. DdrB stimulates single-stranded DNA annealing and facilitates RecA-independent DNA repair in *Deinococcus radiodurans*. *DNA Repair (Amst)* 9:805–812. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.04.006>.
- Bouthier de la Tour C, Mathieu M, Meyer L, Dupaigne P, Passot F, Servant P, Sommer S, Le Cam E, Confalonieri F. 2017. *In vivo* and *in vitro* characterization of DdrC, a DNA damage response protein in *Deinococcus radiodurans* bacterium. *PLoS One* 12:e0177751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177751>.
- Blanchard L, Guerin P, Roche D, Cruveiller S, Pignol D, Vallenet D, Armengaud J, de Groot A. 2017. Conservation and diversity of the IrrE/DdrO-controlled radiation response in radiation-resistant *Deinococcus* bacteria. *Microbiologyopen* 6:e00477. <https://doi.org/10.1002/mbo3.477>.
- Wang L, Xu G, Chen H, Zhao Y, Xu N, Tian B, Hua Y. 2008. DrRRA: a novel response regulator essential for the extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *Mol Microbiol* 67:1211–1222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06113.x>.
- Yang S, Xu H, Wang J, Liu C, Lu H, Liu M, Zhao Y, Tian B, Wang L, Hua Y. 2016. Cyclic AMP receptor protein acts as a transcription regulator in response to stresses in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS One* 11:e0155010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155010>.
- Shimada T, Fujita N, Yamamoto K, Ishihama A. 2011. Novel roles of cAMP receptor protein (CRP) in regulation of transport and metabolism of carbon sources. *PLoS One* 6:e20081. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020081>.
- Kohl TA, Baumbach J, Jungwirth B, Puhler A, Tauch A. 2008. The GlxR regulon of the amino acid producer *Corynebacterium glutamicum*: *in silico* and *in vitro* detection of DNA binding sites of a global transcription regulator. *J Biotechnol* 135:340–350. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.05.011>.
- Bai G, McCue LA, McDonough KA. 2005. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Rv3676 (CRPmt), a cyclic AMP receptor protein-like DNA binding protein. *J Bacteriol* 187:7795–7804. <https://doi.org/10.1128/JB.187.22.7795-7804.2005>.
- Redfield RJ, Cameron AD, Qian Q, Hinds J, Ali TR, Kroll JS, Langford PR. 2005. A novel CRP-dependent regulon controls expression of competence genes in *Haemophilus influenzae*. *J Mol Biol* 347:735–747. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.01.012>.
- Oberto J. 2010. FITBAR: a web tool for the robust prediction of prokaryotic regulons. *BMC Bioinformatics* 11:554. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-554>.
- Schneider TD, Stormo GD, Gold L, Ehrenfeucht A. 1986. Information content of binding sites on nucleotide sequences. *J Mol Biol* 188:415–431. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90165-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90165-8).
- Hua X, Hua Y. 2016. Improved complete genome sequence of the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1 obtained using PacBio single-molecule sequencing. *Genome Announc* 4:e00886-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00886-16>.
- Schmid AK, Howell HA, Battista JR, Peterson SN, Lidstrom ME. 2005. Global transcriptional and proteomic analysis of the Sig1 heat shock

- regulon of *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 187:3339–3351. <https://doi.org/10.1128/JB.187.10.3339-3351.2005>.
35. Schmid AK, Howell HA, Battista JR, Peterson SN, Lidstrom ME. 2005. HspR is a global negative regulator of heat shock gene expression in *Deinococcus radiodurans*. *Mol Microbiol* 55:1579–1590. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04494.x>.
 36. White O, Eisen JA, Heidelberg JF, Hickey EK, Peterson JD, Dodson RJ, Haft DH, Gwinn ML, Nelson WC, Richardson DL, Moffat KS, Qin H, Jiang L, Pamphile W, Crosby M, Shen M, Vamathevan JJ, Lam P, McDonald L, Utterback T, Zalewski C, Makarova KS, Aravind L, Daly MJ, Minton KW, Fleischmann RD, Ketchum KA, Nelson KE, Salzberg S, Smith HO, Venter JC, Fraser CM. 1999. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* 286:1571–1577. <https://doi.org/10.1126/science.286.5444.1571>.
 37. Mennecier S, Servant P, Coste G, Bailone A, Sommer S. 2006. Mutagenesis via IS transposition in *Deinococcus radiodurans*. *Mol Microbiol* 59:317–325. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04936.x>.
 38. Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, Tatusov RL, Minton KW, Koonin EV, Daly MJ. 2001. Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:44–79. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.1.44-79.2001>.
 39. Pasternak C, Dulerio R, Ton-Hoang B, Debuchy R, Siguier P, Coste G, Chandler M, Sommer S. 2013. IS*Dra2* transposition in *Deinococcus radiodurans* is downregulated by TnpB. *Mol Microbiol* 88:443–455. <https://doi.org/10.1111/mmi.12194>.
 40. Pasternak C, Ton-Hoang B, Coste G, Bailone A, Chandler M, Sommer S. 2010. Irradiation-induced *Deinococcus radiodurans* genome fragmentation triggers transposition of a single resident insertion sequence. *PLoS Genet* 6:e1000799. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000799>.
 41. Mennecier S, Coste G, Servant P, Bailone A, Sommer S. 2004. Mismatch repair ensures fidelity of replication and recombination in the radioresistant organism *Deinococcus radiodurans*. *Mol Genet Genomics* 272:460–469. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1077-6>.
 42. Lawson CL, Swigon D, Murakami KS, Darst SA, Berman HM, Ebricht RH. 2004. Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr Opin Struct Biol* 14:10–20. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.01.012>.
 43. Passner JM, Schultz SC, Steitz TA. 2000. Modeling the cAMP-induced allosteric transition using the crystal structure of CAP-cAMP at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol* 304:847–859. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4231>.
 44. Scott SP, Jarjous S. 2005. Proposed structural mechanism of *Escherichia coli* cAMP receptor protein cAMP-dependent proteolytic cleavage protection and selective and nonselective DNA binding. *Biochemistry* 44:8730–8748. <https://doi.org/10.1021/bi0479609>.
 45. Stapleton M, Haq I, Hunt DM, Arnvig KB, Artymiuk PJ, Buxton RS, Green J. 2010. *Mycobacterium tuberculosis* cAMP receptor protein (Rv3676) differs from the *Escherichia coli* paradigm in its cAMP binding and DNA binding properties and transcription activation properties. *J Biol Chem* 285:7016–7027. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.047720>.
 46. Green J, Stapleton MR, Smith LJ, Artymiuk PJ, Kahramanoglou C, Hunt DM, Buxton RS. 2014. Cyclic-AMP and bacterial cyclic-AMP receptor proteins revisited: adaptation for different ecological niches. *Curr Opin Microbiol* 18:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.01.003>.
 47. Agari Y, Kashiwara A, Yokoyama S, Kuramitsu S, Shinkai A. 2008. Global gene expression mediated by *Thermus thermophilus* Sdrp, a CRP/FNR family transcriptional regulator. *Mol Microbiol* 70:60–75. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06388.x>.
 48. Gancedo JM. 2013. Biological roles of cAMP: variations on a theme in the different kingdoms of life. *Biol Rev Camb Philos Soc* 88:645–668. <https://doi.org/10.1111/brv.12020>.
 49. Kamble VA, Rajpurohit YS, Srivastava AK, Misra HS. 2010. Increased synthesis of signaling molecules coincides with reversible inhibition of nucleolytic activity during postirradiation recovery of *Deinococcus radiodurans*. *FEMS Microbiol Lett* 303:18–25. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01855.x>.
 50. Chou FI, Tan ST. 1991. Salt-mediated multicell formation in *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 173:3184–3190. <https://doi.org/10.1128/jb.173.10.3184-3190.1991>.
 51. Badrinarayanan A, Le TB, Laub MT. 2015. Bacterial chromosome organization and segregation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 31:171–199. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125211>.
 52. Possoz C, Junier I, Espeli O. 2012. Bacterial chromosome segregation. *Front Biosci* 17:1020–1034. <https://doi.org/10.2741/3971>.
 53. Charaka VK, Misra HS. 2012. Functional characterization of the role of the chromosome I partitioning system in genome segregation in *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 194:5739–5748. <https://doi.org/10.1128/JB.00610-12>.
 54. Charaka VK, Mehta KP, Misra HS. 2013. ParA encoded on chromosome II of *Deinococcus radiodurans* binds to nucleoid and inhibits cell division in *Escherichia coli*. *J Biosci* 38:487–497. <https://doi.org/10.1007/s12038-013-9352-5>.
 55. Maurya GK, Modi K, Misra HS. 2016. Divisome and segrosome components of *Deinococcus radiodurans* interact through cell division regulatory proteins. *Microbiology* 162:1321–1334. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000330>.
 56. Devigne A, Bouthier de la Tour C, Guérin P, Lisboa J, Quevillon-Cheruel S, Armengaud J, Sommer S, Servant P. 2016. PprA protein is involved in chromosome segregation via its physical and functional interaction with DNA gyrase in irradiated *Deinococcus radiodurans* bacteria. *MSphere* 1:e00036-15. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00036-15>.
 57. Meima R, Lidstrom ME. 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.3856-3867.2000>.
 58. Meima R, Rothfuss HM, Gewin L, Lidstrom ME. 2001. Promoter cloning in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 183:3169–3175. <https://doi.org/10.1128/JB.183.10.3169-3175.2001>.
 59. Norais C, Servant P, Bouthier-de-la-Tour C, Coureux PD, Ithurbide S, Vannier F, Guerin PP, Dulberger CL, Satyshur KA, Keck JL, Armengaud J, Cox MM, Sommer S. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056558>.
 60. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:research0034.1–research0034.11. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>.
 61. Bouthier de la Tour C, Toueille M, Jolivet E, Nguyen HH, Servant P, Vannier F, Sommer S. 2009. The *Deinococcus radiodurans* SMC protein is dispensable for cell viability yet plays a role in DNA folding. *Extremophiles* 13:827–837. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0270-2>.
 62. Durbin R, Eddy S, Krogh A, Mitchison G. 1998. Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
 63. Barash Y, Elidan G, Kaplan T, Friedman N. 2005. CIS: compound importance sampling method for protein-DNA binding site p-value estimation. *Bioinformatics* 21:596–600. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti041>.
 64. Anderson AW, Nordon HC, Cain RF, Parrish G, Duggan G. 1956. Studies on a radio-resistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food Technol* 10:575–577.
 65. Passot FM, Nguyen HH, Dard-Dascot C, Thermes C, Servant P, Espeli O, Sommer S. 2015. Nucleoid organization in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mol Microbiol* 97:759–774. <https://doi.org/10.1111/mmi.13064>.

SUPPLEMENTAL DATA

SUPPLEMENTAL FIGURES

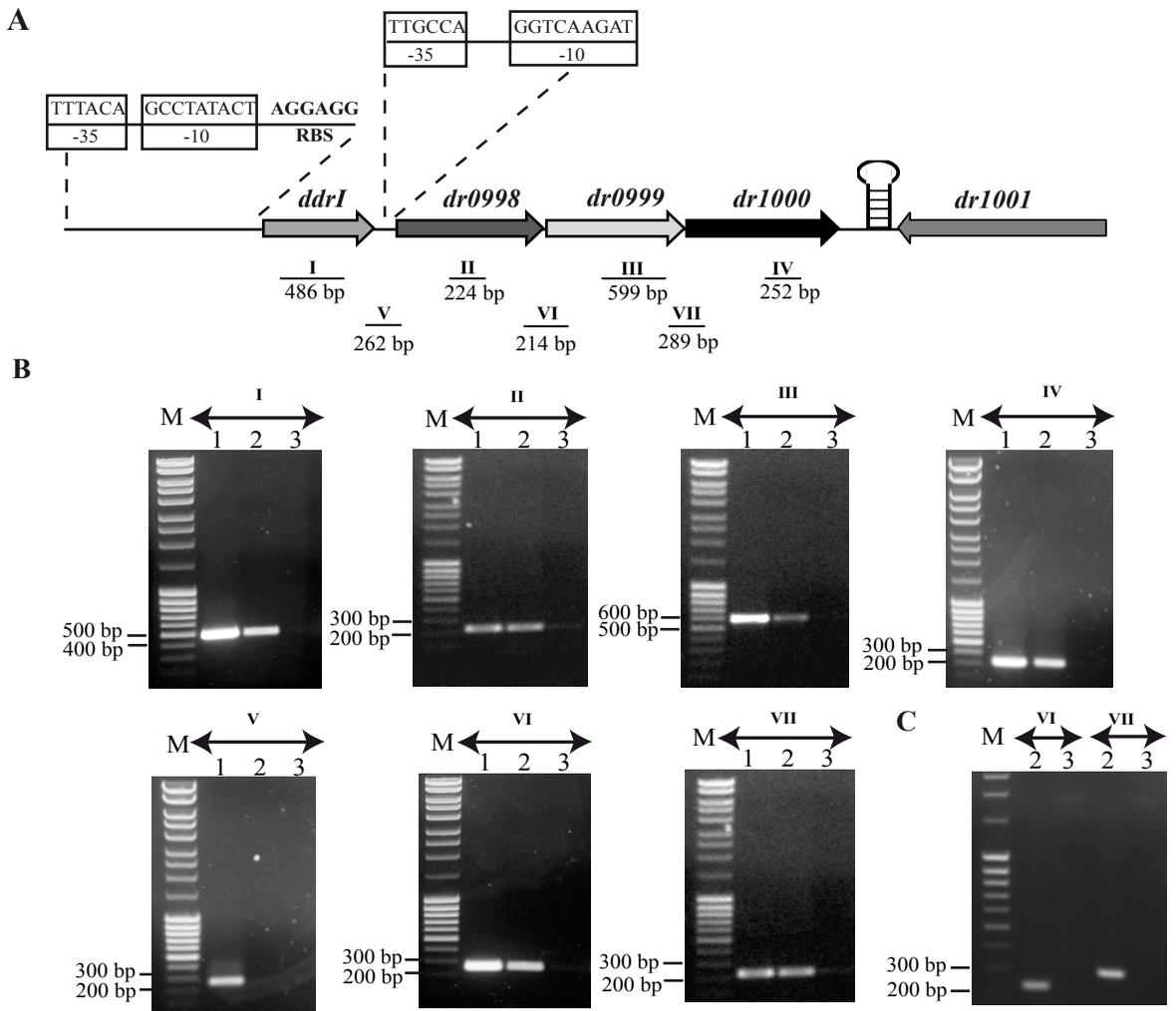


Figure S1. Genetic organization of the *ddrI* chromosomal region.

A. The coding sequences (CDS) of *ddrI* (*dr0997*), *dr0998*, *dr0999*, *dr1000* and *dr1001* are shown as arrows indicating their transcription direction. The -35 and -10 putative promoter regions upstream of the coding sequences of *ddrI* and *dr0998* are boxed. A putative Shine-Dalgarno sequence located upstream of the *ddrI* start codon is indicated in bold characters, and a Rho-independent transcription terminator is shown by the stem-loop structure downstream of the *dr1000* gene. B. RT-PCR analysis of the *ddrI* chromosomal region. PCR analyses were performed from two independent biological replicates of R1 wild-type *D. radiodurans* strain, using genomic DNA (lane 1), cDNA (lane 2), or total RNA (lane 3) as template and primer pairs designed to amplify either internal regions of each CDS (I, II, III, and IV) or regions overlapping two genes (V, VI and VII). C. RT-PCR analysis of the *dr0998-dr0999-dr1000* region in the $\Delta ddrI$ mutant. The predicted sizes of each PCR amplicon deduced from the genome sequence are indicated at each position.

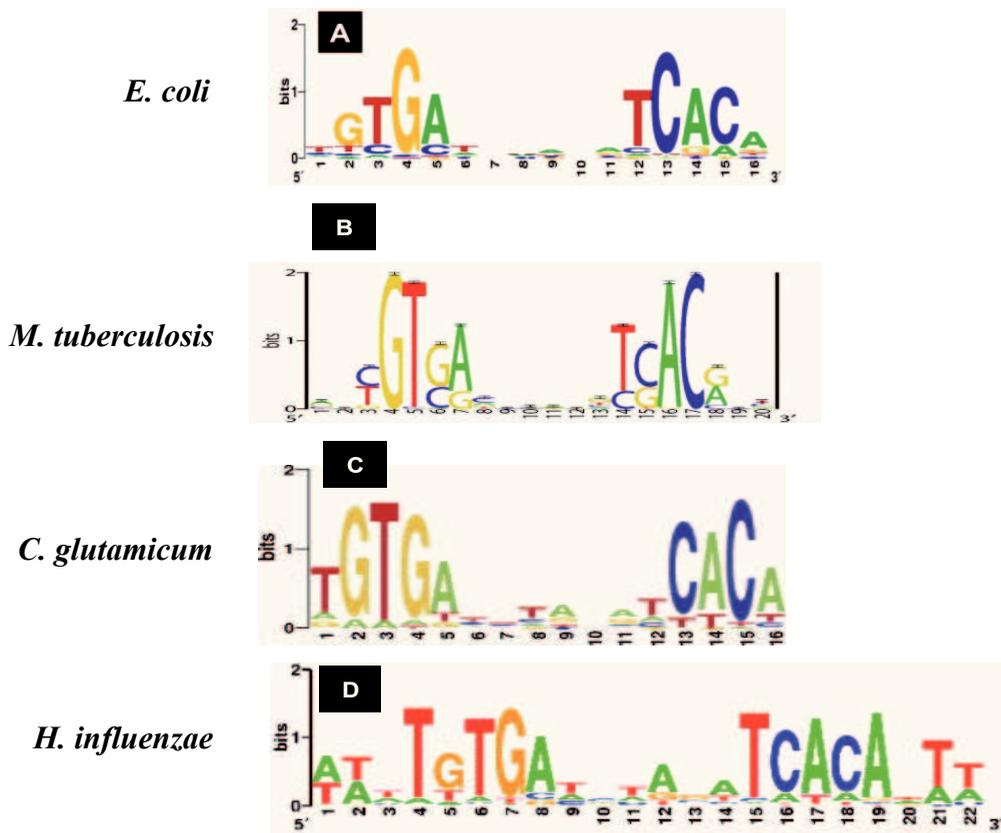


Figure S2. Conservation of DNA sequences recognized by transcription factors belonging to the CRP family.

Sequence logos of the *E. coli* CRP_{Ec} (1), the *M. tuberculosis* CRP_{Mt} (2), the *C. glutamicum* GlxR (3) and the *H. influenzae* CRP (4) binding sites are shown.

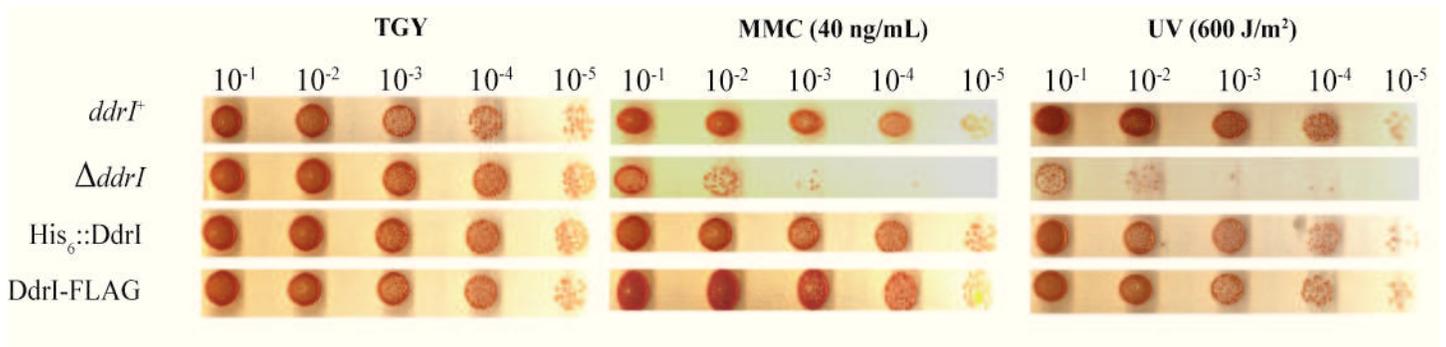


Figure S3. *In vivo* functionality assays of His₆- or FLAG-tagged DdrI proteins.

GY9613 (wild type), GY13630 ($\Delta ddrI$), GY13645 ($\Delta ddrI / his_6::ddrI^+$) and GY13663 ($\Delta ddrI / ddrI-FLAG$) were grown in TGY2X liquid medium to an $A_{650nm} = 1$. Appropriate dilutions were spotted onto TGY agar plates supplemented (or not) with MMC (40 ng/mL), or exposed to UVC rays (600 J/m²), and incubated for 3 days at 30°C.

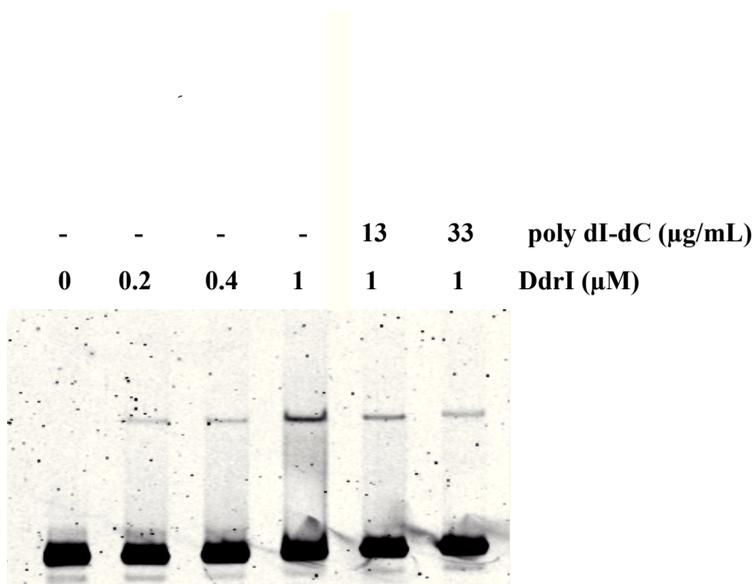


Figure S4. DdrI binds to a DNA fragment containing a variant of the predicted DdrI binding consensus sequence.

Electrophoretic mobility shift assays performed with a 102 bp DNA fragment containing the TGT TAAAAAACTTACA variant of the predicted DdrI binding site included in the *sodC* (*dr1546*) promoter region and the recombinant His₆::DdrI protein (0, 0.2, 0.4 or 1 μM), in presence of cAMP (200 μM) and in presence or absence of a poly dI-dC competitor.

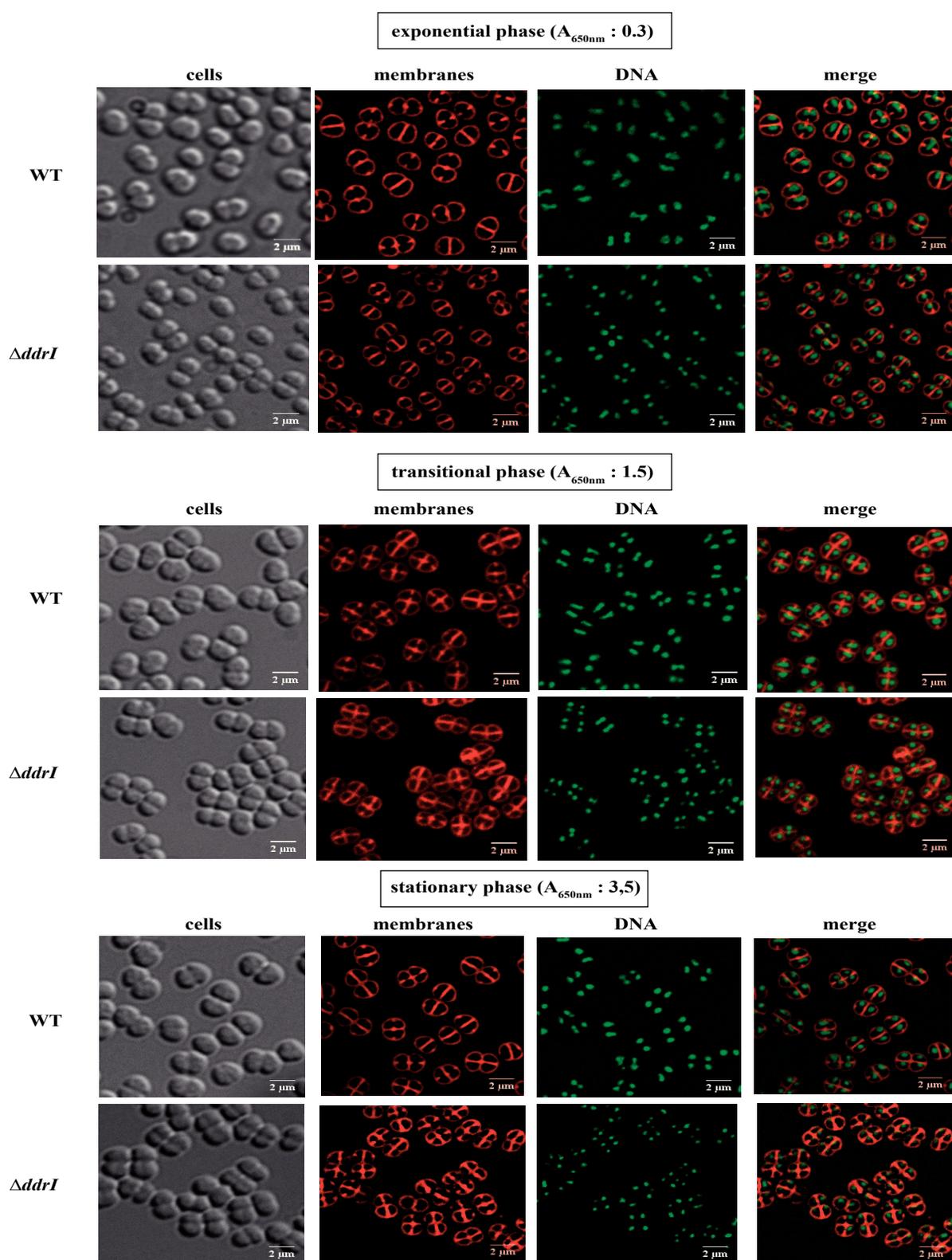


Figure S5. Observation by fluorescence microscopy of cells devoid of DdrI during exponential, transitional and stationary phases.

Fluorescence microscopy analyses of exponential ($A_{650\text{nm}} = 0.5$), transitional ($A_{650\text{nm}} = 1.5$) and stationary ($A_{650\text{nm}} = 3.5$) phases cells of GY9613 (wild-type) and GY13630 ($\Delta ddrI$) strains. Membranes and nucleoids were stained with FM4-64 (red) and DAPI (green), respectively. From left to right panels: Nomarski interference contrast (DIC), membrane staining, DNA staining, and overlays of membrane and DNA staining pictures. All pictures are at the same scale (Bars: $2\mu\text{m}$).

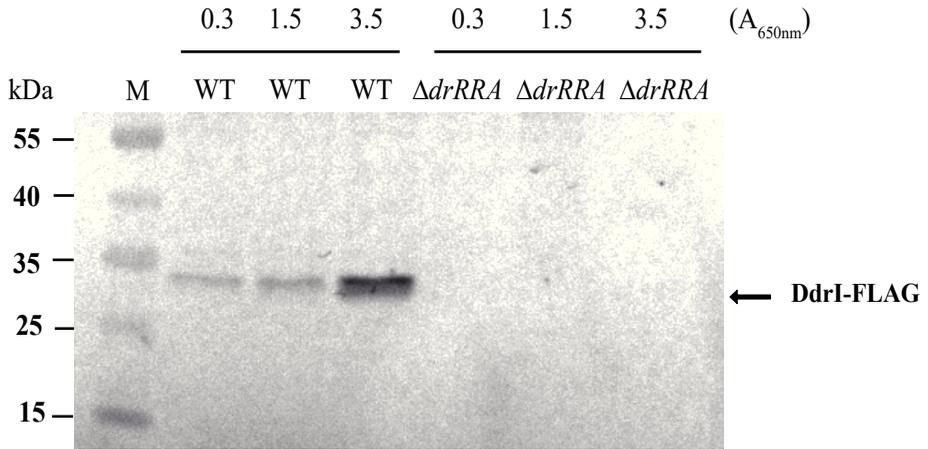


Figure S6. Expression of DdrI is induced in stationary phase in a DrRRA dependent manner.

Exponential ($A_{650nm} = 0.3$), transitional ($A_{650nm} = 1.5$) and stationary ($A_{650nm} = 3.5$) phase cultures of GY13663 ($drRRA^+ ddrI-FLAG$) and GY13679 ($\Delta drRRA ddrI-FLAG$) bacteria grown at 30°C before western blot analysis with anti-FLAG antibodies of their protein extracts (10 μ g).

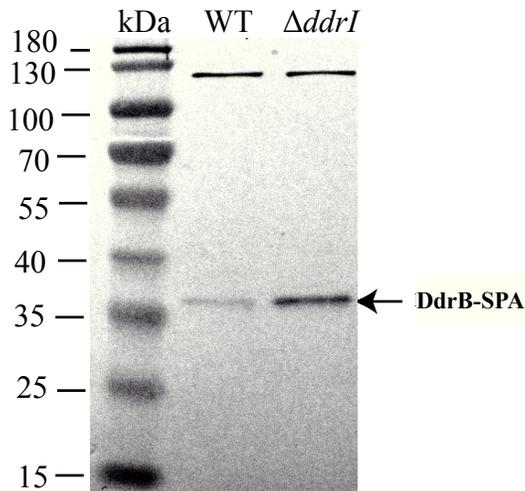
A**B**

Figure S7. Deletion of *ddrI* induces expression of the DdrB protein.

A. GY12830 (*ddrI*⁺ *ddrB*-FLAG) or GY13653 (Δ *ddrI* *ddrB*-FLAG) strains were grown to an $A_{650\text{nm}} = 0.5$. The DdrB-FLAG tagged protein was visualized by western-blot analysis with anti-FLAG antibodies. B. Schematic representation of the *ddrB* promoter region. The -35 and -10 promoter regions of *ddrB* are boxed. The putative DdrI binding site overlapping the RDRM motif (in red) recognized by the DdrO repressor is underlined. A putative Shine-Dalgarno sequence upstream of the *ddrB* start codon, and the beginning of the coding sequence of *ddrB*, are indicated in bold letters and by an arrow, respectively.

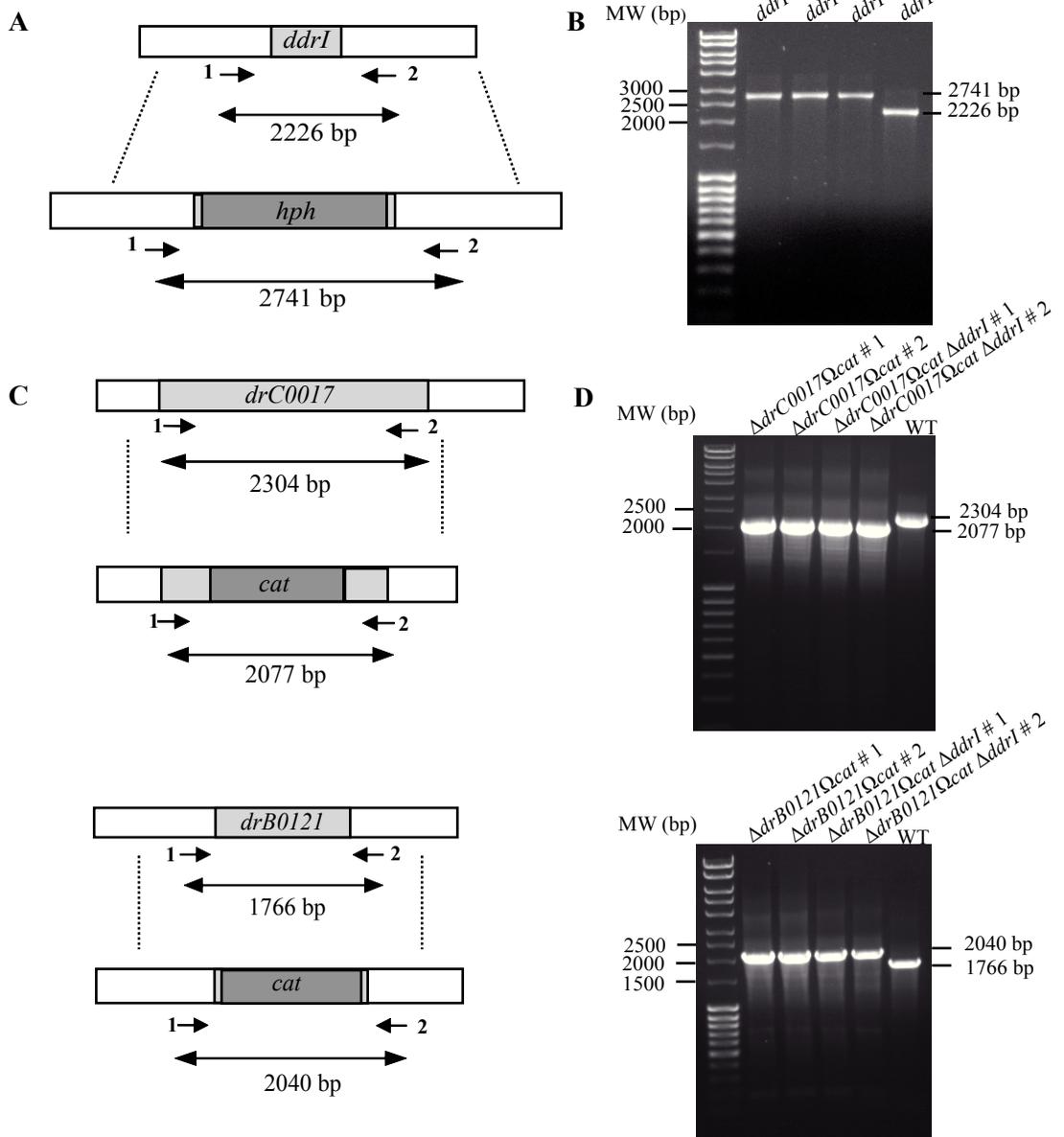


Figure S8. Genetic structure and purity of the $\Delta ddrI\Omega hph$ mutant and the strains containing a $\Delta drC0017\Omega cat$, or a $\Delta drB0121\Omega cat$, loci.

A. Schematic representation of the allelic replacement of the *ddrI* gene by the *hph* cassette conferring resistance to hygromycin. B. PCR analyses were performed using genomic DNA of three independent $\Delta ddrI\Omega hph$ mutants and R1 wild type strain as templates. C. Schematic representation (left panel) of the allelic replacement of the *drC0017* gene, located on the CP1 plasmid, or the *drB0121* gene, located on the MP1 megaplasmid, with the *cat* gene encoding a Cm^R cassette. D. PCR analyses (right panel) were performed with genomic DNA of two homozygous independent (#1 and #2) $\Delta drC0017\Omega cat$, $\Delta drC0017\Omega cat \Delta ddrI$, $\Delta drB0121\Omega cat$ and $\Delta drB0121\Omega cat \Delta ddrI$ mutant strains. The position of the primers used for diagnostic PCR (short arrows) and the size of the expected PCR products are indicated.

SUPPLEMENTARY TABLES

Table S1. *In silico* prediction of putative DdrI targets.

Chromosome I

Strand	Score	P-value	Position	Sequence	Gene(s) downstream (Hua and Hua, 2016)	Gene(s) downstream (White et al, 1999)	Function	position/ ATG*
R	0.51333	0.03047	9068	agtgaacaagaaaaca	A2G07_00035	DR0071	peptidylprolyl isomerase	-2
L				none	a2G07_00030	drt05	tRNA-Arg	*-121
R	0.54174	0.02619	11768	cgtaaataacataaca	none			-14
L	0.62544	0.01384	11784	tgttatgttatttacg	A2G07_00040	DR0070	DNA damage response protein DdrB	-30
R				none	A2G07_00160	DR0044	o-succinylbenzoate synthase	-54
L	0.46871	0.03971	33870	ttttatccgggtaaaa	A2G07_00155	DR0045	hypothetical protein	-23
R	0.58935	0.01832	73496	tgttatgtcaaaaaca	A2G07_00380		DNA damage response protein DdrC	-39
L	0.56272	0.02244	73512	tgttttgacataaca	A2G07_00375	DR0004	MutT Nudix family protein	-113
R	0.52141	0.02915	76028	ggtgaaacttttact	A2G07_00390	DR0001	DNA polymerase III subunit beta	-578
L	0.48209	0.03706	76044	agtgaagtttcacc	A2G07_00390			
R	0.58299	0.01957	85304	cgtgaaatacctcaaa	A2G07_00435	DR2629	PadR family transcriptional regulator	-52
L	0.63988	0.01237	85320	tttgaggattttcacg	A2G07_00430		hypothetical protein	-44
R	0.62251	0.01384	141448	tttgagcagcatcaca	a2G07_00695	drrrnab5s	5S ribosomal RNA	*-28
L	0.65719	0.00916	141464	tgtgatgctgctcaaa	none			
R	0.50647	0.03216	162961	tgtagttttgcttaca	A2G07_00775	DR2563	hypothetical protein	-141
L	0.50591	0.03216	162977	tgtaagcaaaactaca				
R	0.48785	0.03618	192655	none	A2G07_00940	DR2528	hypothetical protein	-2
L				tatgaaggacatcatt	A2G07_00935	DR2531	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	-176
R	0.50284	0.03216	196156	tttctcagatcaca				
L				none	a2G07_00950	drt43	tRNA-Glu	*-178
R	0.66613	0.00875	197671	ttttatattcctcaca	A2G07_00960	DR2525	C4-dicarboxylate transporter	-110
L	0.69415	0.00666	197687	tgtgaggaaatataaaa	A2G07_00955	DR2526	dihydrolipoyl dehydrogenase	-113
R	0.47769	0.03836	200767	tttttttctgtcaaa	A2G07_00975 (pseudogene)	DR2522	lipophospholipase	-45
L	0.50208	0.03290	200783	tttgacagaaaataaa	none			
R	0.50096	0.03290	210826	ttttatagtactcacg	A2G07-01020 (pseudogene)	DR2513	serine-threonine phosphatase PprC	-18

L	0.48832	0.03618	210842	cgtgagtactataaaa	none			
R	0.50238	0.03290	214552	cctgaacttaatacaaa	A2G07_01045	DR2508	hypothetical protein	-561
L	0.52713	0.02856	214568	tttgattaagttcagg	none			
R	0.48566	0.03706	214655	agtgttttgatcacc	A2G07_01045			-458
L	0.54389	0.02619	214671	ggtgatcaaaaacact	none			
L	0.53020	0.02795	224819	gttgacgtgatcaaa	A2G07_01070	DR2503	prolyl endopeptidase	-6
R	0.49828	0.03430	236871	ggagaactttctcaca	A2G07_01135	DR2491	hypothetical protein	-83
L				none	A2G07_01130	DR0750	hypothetical protein	-30
L	0.48495	0.03706	249080	tttgataattaccgaa	A2G07_01190	DR2480	acetyl-CoA acetyltransferase	-71
R	0.56143	0.02293	296266	agtgatacaatttca	A2G07_01450		DNA binding protein	-638
L	0.56189	0.02293	296282	tgaaaattgtatcact	none			
R	0.48073	0.03836	338233	tgctgtacaatcaca	A2G07_01650	DR2386	1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit A	-104
L	0.54843	0.02521	338249	tgtgattgtacagca				
R	0.48271	0.03706	341764	agtgaaattggaaaaaa	A2G07_01670	DR2381	phenylacetic acid degradation bifunctional protein PaaZ	-604
L	0.48550	0.03706	341780	tttttccaattcact	none			
L	0.47095	0.03971	341762	tcttattcttattata	none			
R	0.48247	0.03706	442604	tgatatgcaattcgca				
L				none	A2G07_02145 (pseudogene)	DR2284	manganese ABC transporter ATP-binding protein	-22
R	0.52476	0.02856	463813	tgtgataagaatcccg	A2G07_02245	DR2264	MBL fold metallo-hydrolase	-170
L	0.55079	0.02464	463829	cgggattcttatcaca	A2G07_02240	DR2265	amino acid transporter	-64
R	0.62251	0.01384	479525	tttgagcagcatcaca	a2G07_2310	drrrnaa5s	5Sribosomal RNA	*-28
L	0.65719	0.00916	479541	tgtgatgctgctcaaa	none			
R	0.48301	0.03706	499479	tgagaaatgaaaaaaa	none			
L	0.48428	0.03706	499495	ttttttcatttctca	A2G07_02440	DR2228	hypothetical protein	-50
R	0.48808	0.03618	554720	tgttatgctcatgaca	A2G07_02745	DR2173	hypothetical protein	-18
L	0.48230	0.03706	554736	tgcatgagcataaaca	A2G07_02740	DR0148	leucine-tRNA ligase	-283
R	0.50763	0.03128	661672	ggtgctactattcaca	a2G07_03355	drt34	tRNA-Thr	*-98
L				none	A2G07_03350	DR2051	ABC transporter ATP-binding protein	-298
R	0.47836	0.03836	662211	tttgatatagtttca	A2G07_03375	DR2050	TufA, Elongation factor Tu	-57
L	0.50672	0.03216	662227	tgaacactatatcaaaa	none			

R	0.50253	0.03290	699805	tttgagaactttctca	A2G07_03605	DR2005	50S ribosomal protein L35	-90
L	0.52656	0.02856	699821	tgagaaagtctcaaa	none			
R				none	A2G07_03695	DR1987	hypothetical protein	-134
L	0.47344	0.03907	714224	tgtgcggcatttcata				
R	0.51199	0.03047	731643	tgtaagctaaatcgct				
L	0.52375	0.02915	731659	agcgatttagcttaca	A2G07_03765	DR1974	endopeptidase Lon1	-146
R	0.54164	0.02619	771799	ggtaaaactttgtcaca	A2G07_03970	DR1929	aquaporin	-38
L	0.52750	0.02856	771815	tgtgacaaagtttacc				
R	0.48209	0.03706	791108	cattatgtaatcacg	A2G07_04050	DR1912	protein tyrosine phosphatase	-273
L				none	A2G07_04045	DR1913	DNA gyrase subunit A	-112
R	0.50227	0.03290	791113	tgtaatcacgtaata	A2G07_04050	DR1912	protein tyrosine phosphatase	-268
L	0.51665	0.02971	791129	tattacgtgattaaca	A2G07_04045	DR1913	DNA gyrase subunit A	-117
R				none	A2G07_04095	DR1902	exodeoxyribonuclease V	-220
L	0.49039	0.03530	801148	tgtgattgccgttacg	A2G07_04090	DR1903	fatty acid-binding protein DegV	-1
R	0.65643	0.00916	867669	tgttagtttttact	A2G07_04460	DR1828	hypothetical protein	-180
L	0.59470	0.01778	867685	agtgaaaaactaaca	none			
R	0.56916	0.02178	898330	ttgatcttgaaaaa	none			
L				none	A2G07_04605	DR1797	transcription termination/antitermination protein NusA	-39
L	0.48266	0.03706	911979		A2G07_04675	DR1784	3-isopropylmalate dehydratase	-39
R				none	A2G07_04775	DR1763	hypothetical protein	-99
L	0.50916	0.03128	932629	tttcttttactcact	A2G07_04770	DR1764	glyoxalase	-173
R	0.52513	0.02856	975857	tttggtctgcataaaa	A2G07_04980	DR1722	hypothetical protein	-24
L	0.53539	0.02746	975873	ttttatgcagacaaaa	none			
L	0.48843	0.03618	978226	tatgcttactatcaat	A2G07_04990		hypothetical protein	-692
R	0.51588	0.02971	978504	ttttcagcatatcaaa	none			
L	0.46962	0.03971	978520	tttgatgctgaaaa	A2G07_04990		hypothetical protein	-986
R	0.73016	0.00419	1109937	tgtgaattatttaacg	A2G07_05615	DR1594	hypothetical protein	-85
L	0.66160	0.00901	1109953	cgttaaataattcaca	A2G07_05610	DR1595	6-phosphogluconate dehydrogenase	-129
R	0.53913	0.02687	1130740	ttatatgaggatcaca	A2G07_05725	DR1571	peptide ABC transporter	-140
L	0.57153	0.02126	1130756	tgtgatctcatataa	A2G07_05720	DR1572	DNA helicase UvrD ₂	-228
R				none	A2G07_05780	DR1560	diacylglycerol kinase	-167
L	0.47555	0.03907	1142996	ttggattgaatccaaa	none			

R	0.66189	0.00901	1158636	tgtaaagtttttaaca	A2G07_05845	DR1546	superoxide dismutase	-189
L	0.64196	0.01237	1158652	tgtaaataaaacttaca	A2G07_05840	DR1548	hypothetical protein	-115
R				none	A2G07_05955		hypothetical protein	-296
L	0.52332	0.02915	1183630	tgtgcaggaactcaaa	none			
R	0.47193	0.03971	1327604	gatgacaacaatcaca				
L	0.53138	0.02795	1327620	tgtgattgtgtcatc	A2G07_06600	DR1389	competence protein ComF	-40
R	0.49759	0.03430	1343636	aaaaatttatattaaa	A2G07_06680	DR1371	hypothetical protein	-29
L				none	A2G07_06675	DR1372	Water stress and hypersensitive response domain-containing protein	-38
R	0.62018	0.01431	1389214	tttgaataatttctca	A2G07_06900	DR1324	transporter	-195
L	0.62793	0.01362	1389230	tgagaaaattttcaaa	A2G07_06895	DR1325	peptidase	-153
R	0.51459	0.03047	1396105	cttgaactgagcaaa				
L	0.53325	0.02746	1396121	tttgactcagttcaag	A2G07_06930	DR1318	acyl-CoA dehydrogenase	-61
L	0.46955	0.03971	1409268	tgtgctcgttctca	A2G07_07005	DR1304	spermidine/putrescine ABC transporter permease	-113
R	0.58186	0.01957	1411406	tctgacctcatcaca	A2G07_07020	DR1301	hypothetical protein	-254
L	0.59693	0.01707	1411422	tgtgatgaaggtcaga	A2G07_07015	DR1302	Fe ³⁺ /spermidine/putrescine ABC transporter ATP-binding protein	-39
R	0.57213	0.02126	1426212	tgtgacttgttctaca	A2G07_07090	DR1287	hypothetical protein	-238
L	0.49247	0.03530	1426228	tgtagaacaagtcaaca				
R	0.49872	0.03290	1449116	ctcgaattgaatcaca	A2G07_07220	DR1262	SS-A/Ro ribonucleo-like protein	-42
L	0.56356	0.02244	1449132	tgtgattcaattcgag				
R	0.48160	0.03706	1501391	tggtatcgtctctca	A2G07_07470		hypothetical protein	-277
R	0.79022	0.00135	1519257	tgagaattatttcaca	none			
L	0.75897	0.00267	1519273	tgtgaaataattctca	A2G07_07555	DR1193	hypothetical protein	-129
L	0.46911	0.03971	1521966	ggtgatagaaatagaa	A2G07_07565	DR1191	tRNA nucleotidyltransferase	-170
R	0.51955	0.02971	1681676	ttagatttaacttgca	A2G07_08385	DR1026	2-hydroxy-acid oxidase	-99
L				none	A2G07_08380	DR1027	amino acid ABC transporter substrate-binding protein	-56
R	0.48933	0.03618	1714665	tgtgacgtgcttcatt	A2G07_08550	DR0989	hypothetical protein	-50
L	0.48768	0.03618	1714681	aatgaagcacgtcaca	A2G07_08545	DR0990	acetoin dehydrogenase	-105
R	0.48467	0.03706	1714710	tgatcatgaagatcacc	A2G07_08550	DR0989	hypothetical protein	-5
L				none	A2G07_08545	DR0990	acetoin dehydrogenase	-150
R	0.58988	0.01832	1726927	aatgatttgtctcaaa	none			
L	0.57050	0.02178	1726943	tttgagcaaaatcatt	A2G07_08600	DR0980	amino acid dehydrogenase	-48

R	0.60769	0.01585	1763588	cgtgaactttcaca	A2G07_08760	DR0950	NADH dehydrogenase	-29
L	0.62266	0.01384	1763604	tgtgaaagtattcacg	none			
R	0.56796	0.02178	1870279	tgtgatgcctatccca	A2G07_09295	DR0843	transglutaminase	-40
L	0.58492	0.01911	1870295	tgggatagggcatcaca	A2G07_09290	DR0844	thioredoxin domain-containing protein	-69
R	0.56084	0.02293	1966428	tgtgatgaatagaact	A2G07_09790	DR0743	DNA-binding response regulator	-66
L	0.53658	0.02746	1966444	agttctattcatcaca	A2G07_09785	DR0744	two-component sensor histidine kinase	-232
R	0.67199	0.00833	1994176	tgtaaaagttttaaca	A2G07_09925	DR0713	lipopolysaccharide glycosyltransferase	-184
L	0.65288	0.00946	1994192	tgtaaaaaactttaca	none			
R				none	A2G07_09950	DR0708	hypothetical protein	-123
L	0.63392	0.01323	2000136	tgtgaaaaacttaact	none			
R				none	A2G07_09955	DR0707	hypothetical protein	-111
L	0.47906	0.03836	2002527	tatgactcaagacaaa	none			
L	0.50830	0.03128	2029282	cgtgatcggctcaaaa	A2G07_10060		DDE endonuclease	-125
R	0.63758	0.01289	2035350	tatgagatttctcaca	none			
L	0.60969	0.01529	2035366	tgtgagaaatctcata	A2G07_10075	DR0685	hypothetical protein	-287
R	0.58392	0.01911	2054088	tttgatttatttctca	A2G07_10185	DR0659	disulfide bond formation protein DsbA	-37
L	0.53183	0.02795	2054104	tagaaaaataaatcaaaa	none			
R	0.58589	0.01911	2072976	ttttattttctcgca	A2G07_10290	DR0638	hypothetical protein	-218
L	0.54028	0.02687	2072992	tgcgagaaaaataaaa	A2G07_10275		methionine adenosyl transferase	-425
R	0.49952	0.03290	2103527	tttggtttataaaaata				
L	0.46940	0.03971	2103543	tattttataaaccaaaa	A2G07_10430	DR0611	alkane 1-monooxygenase	-33
R	0.53150	0.02795	2198232	tgtgaaacacttaag	A2G07_10885	DR0526	hypothetical protein	-42
L	0.51854	0.02971	2198248	ctttaagtgtttcaca				
R	0.57390	0.02126	2301859	tgttattctgttctaa	A2G07_11420	DR0423	DNA damage response protein DdrA	-26
L	0.54932	0.02521	2301875	ttagaacagaataaca	A2G07_11415	DR0424	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	-188
L	0.54703	0.02521	2360836	tatgatcaatttcac	A2G07_11715	DR0364	peptide ABC transporter permease	-1
R				none	A2G07_11725	DR0362	D-alanine ligase	-249
L	0.47928	0.03836	2362770	tatgaaaaaagttgca	A2G07_11720	DR0363	peptide ABC transporter substrate-binding protein	-1

R	0.65719	0.00916	2471217	tgtgatgctgctcaaa	none			
L	0.62251	0.01384	2471233	tttgagcagcatcaca	a2G07_12270	drrrnac5s	5Sribosomal RNA	*-27
R				none	A2G07_12415	DR0224	phosphoribosylformylglycine midine synthase	-245
L	0.48939	0.03618	2498277	tttcatctagaacaaa	none			
R	0.58172	0.01957	2563641	tgaaatccacatcaaa	none			
L	0.60549	0.01585	2563657	tttgatgtggattca	A2G07_12730	DR0160	hypothetical protein	-103
R				none	A2G07_12890	DR0125	acetyltransferase	-166
L	0.51433	0.03047	2601010	ttttctgaaattcact	none			
R	0.48513	0.03706	2624178	tgcaatgacataaaa	none			
L	0.48405	0.03706	2624194	ttttatgtcattgaca	A2G07_13010	DR0100	single-stranded DNA-binding protein	-116

Chromosome 2

R	0.53266	0.02665	35320	tttgacaaattgcaca	A2G07_13270	DRA0320	urea ABC transporter substrate- binding protein	-50
L	0.59835	0.01720	35336	tgtgcaatttgcaaa	A2G07_13265	DRA0319	Urease subunit beta/gamma	-177
R	0.65622	0.00857	78030	tgtgaagtcctttaca	A2G07_13430	DRA0350	histidine kinase	-163
L	0.62689	0.01289	78046	tgtaaaggacttcaca	none			
R	0.50212	0.03148	101777	tgagaaataaagcact	none			
L	0.57944	0.01933	101793	agtgcctttatttctca	A2G07_13515	DRA0368	glycosyl transferase	-138
R	0.46495	0.03951	103555	tttaaagataaaaaca	A2G07_13525	DRA0001	chromosome partitioning protein ParA	-545
L	0.49506	0.03319	103571	tgtttttatctttaa	A2G07_13520	DRA0369	hypothetical protein	-287
R	0.48025	0.03552	103578	gatgatcatcatcata	A2G07_13525	DRA0001	chromosome partitioning protein ParA	-522
L	0.48186	0.03552	103594	tatgatgatgatcatc	A2G07_13520	DRA0369	hypothetical protein	-310
R	0.59834	0.01720	167048	tttaaagcttatcaaa				
L	0.61107	0.01551	167064	tttgataagctttaa	A2G07_13780	DRA0058	hypothetical protein	-113
R	0.47231	0.03772	213595	tttgttgtaaccaca	A2G07_14045	DRA0113	hypothetical protein	-127
L	0.47510	0.03623	213611	tgtggttagcaacaaa				
R	0.50566	0.03069	244361	tgtgctcttgaacg	none			
L				none	A2G07_14180	DRA0140	hypothetical protein	-195
R				none	A2G07_14195	DRA0143	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	-245
L	0.55090	0.02376	245687	taagattattcaaca	A2G07_14190	DRA0142	hypothetical protein	-37
R				none	A2G07_14210	DRA0146	catalase	-57
L	0.47399	0.03772	249016	tttacttcagttcact	none			

R	0.68933	0.00595	249055	tatgaattacgtcaaa	A2G07_14210	DRA0146	catalase	-2
L				none	none			
R	0.51916	0.02893	267853	ggttatgctatttaca	A2G07_14305	DRA0165	hypothetical protein	-236
R	0.49748	0.03214	267858	tgctatttacataacc	A2G07_14305	DRA0165	hypothetical protein	-231
L	0.50552	0.03069	267874	ggttatgtaaatagca	none			
R	0.60674	0.01614	353376	tgtgatgctcggtctca	none			
L	0.58345	0.01901	353392	tgagaccgacatcaca	A2G07_14660	DR1724	FAD-binding dehydrogenase	-27
L	0.46228	0.03951	379188	tgtttcttttttcacg	A2G07_14755	DRA0259	catalase HPII	-135
R	0.49167	0.03319	384242	cttgaggcagttcaca	A2G07_14780	DRA0264	long-chain fatty acid-CoA ligase	-279
L	0.52061	0.02893	384258	tgtgaactgcctcaag	A2G07_14775	DRA0263	branched-chain amino acid ABC transporter substrate- binding protein	-102
R	0.67042	0.00791	392639	tgtaattttttctct	A2G07_14810	DRA0271	sugar transporter	-82
L	0.60816	0.01551	392655	agagaaataaattaca	A2G07_14805	DRA0270	adenosine deaminase	-159
R				none	A2G07_14845	DRA0279	hypothetical protein	-108
L	0.48096	0.03552	403298	tttgatgagttttct	A2G07_14840	DRA0277	malate synthase A	-680

Megaplamid MP1

R	0.71929	0.00546	2121	ggtgatatttatcaaa	A2G07_14975		hypothetical protein	-506
L	0.70187	0.00588	2137	tttgataaatatcacc				
R	0.47140	0.03907	24860	tttgagaccgatcaccg	A2G07_15045	DRB0055	hypothetical protein	-527
L	0.51830	0.02949	24876	cgatgatcggtctcaaa	A2G07_15040	DRB0056	DDE endonuclease	-125
R	0.55150	0.02396	36543	cgggatttagctcaca	none			
L				none	A2G07_15100	DRB0045	hypothetical protein	-60
R	0.55005	0.02462	38121	agagactttcatcaca	none			
L	0.60027	0.01754	38137	tgtgatgaaagtctct	A2G07_15105	DRB0044	diguanylate cyclase	-32
R	0.59627	0.01754	89523	ttttaagtatttaaaa	A2G07_15320	DRB0145	Plasmid replication initiator protein	-41
L	0.56001	0.02251	89539	ttttaaacttaaaa	A2G07_15315	DRB0001	ParA family chromosome partitioning ATPase	-617
R	0.54732	0.02462	127185	tgtgttttaaaactca	A2G07_15460	DRB0118	hypothetical protein	-144
L	0.54911	0.02462	127201	tgagttttaaaacaca	none			
R				none	A2G07_15485	-	hypothetical protein	-296
L	0.52407	0.02854	132238	tgtgcaggaactcaaa	A2G07_15480	DRB0113	transposase	-287

Plasmid CP1

R	0.48434	0.03782	3415	tgatatttgattcacc	A2G07_15805		hypothetical protein	
---	---------	---------	------	------------------	-------------	--	----------------------	--

The *in silico* prediction of potential DdrI targets in the *D. radiodurans* genome was performed by using the FITBAR web tool. This analysis was performed on the completely sequenced *D. radiodurans* genome (5) by using, the 166 binding sites recognized by *E. coli* CRP protein (1). The list of putative DdrI binding sites has been sorted by position and only predicted sites located from -650 to + 3 bp of the downstream coding sequence have been conserved.

Table S2. Second round of *in silico* prediction of putative DdrI binding.

Chromosome 1

Strand	Score	P-value	Position	Sequence	Gene(s) downstream (Hua and Hua, 2016)	Gene(s) downstream (White et al, 1999)	Function	position of ATG or beginning of ribosomal RNA	position/ATG*
R	0.54174	0.02619	11768-11784	cgtaaataacataaca	none				
L	0.62544	0.01384	11784-11768	tgttatgtatttacg	A2G07_00040	DR0070	DNA damaged response protein DdrB	11754	-30
R	0.58935	0.01832	73496-73512	tgttatgtcaaaaaca	A2G07_00380		DNA damage response protein DdrC	73535	-39
L	0.56272	0.02244	73512-73496	tgtttttgacataaca	A2G07_00375	DR0004	DNA mismatch repair protein MutT MutT/nudix family protein	73399	-113
R	0.52141	0.02915	76028-76044	ggtgaaacttttcaact	A2G07_00390	DR0001	DNA polymerase III subunit beta	76606	-578
R	0.58495	0.02886	76274-76290	tgtttttttttttaa	A2G07_00390	DR0001	DNA polymerase III subunit beta	76606	-332
R	0.58022	0.03028	76277-76293	tttttttttaagaa	A2G07_00390	DR0001	DNA polymerase III subunit beta	76606	-329
L	0.5354	0.03951	76298-76282	tgttctcttaaaaaa	none				
L	0.55513	0.03552	76290-76274	ttaaaaataaaaaaca	none				
R	0.58299	0.01957	85304-85320	cgtgaaactcctcaaaa	A2G07_00435	DR2629	PadR family transcriptional regulator	85356	-52
L	0.63988	0.01237	85320-85304	tttgaggtatttcacg	A2G07_00430		hypothetical protein	85276	-44
R	0.62251	0.01384	141448-141464	tttgagcagcatcaca	A2G07_00695	drnnab5s	5S ribosomal RNA	141476	*-28
L	0.65719	0.00916	141464-141448	tgatgatgctctcaaaa	none				
R					A2G07_00815	DR2555	aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit B	167586	-184
L	0.53813	0.03959	167408-167392	tgtagactctcata	A2G07_00810	DR2556	response regulator	167393	-15
R	0.66613	0.00875	197671-197687	ttttatattctcaca	A2G07_00960	DR2525	C4-dicarboxylate transporter	197781	-110
L	0.69415	0.00666	197687-197671	tgtaggaataataaaa	A2G07_00955	DR2526	dihydropolyl dehydrogenase	197574	-113
R	0.47769	0.03836	200767-200783	tttattttctgtcaaaa	A2G07_00975 (pseudogene)	DR2522	lipophospholipase	200812	-45

L	0.50208	0.03290	200783-200767	tttgacagaaaataaa	none				
R	0.50096	0.03290	210826-210842	ttttatagtactcacg	A2G07-01020 (pseudogene)	DR2513	serine-threonine phosphatase PprC	210844	-18
L	0,48832	0.03618	210842-210826	cgtgagtactataaaa	none				
L	0.48495	0.03706	249080-249064	tttgataattaccgaa	A2G07_01190	DR2480	acetyl-CoA acetyltransferase	2490009	-71
R	0.56143	0.02293	296266-296282	agtgatacaattttca	A2G07_01450		DNA binding protein	296904	-638
L	0.56189	0.02293	296282-296266	tgaaaattgtatcact	none				
R	0.54279	0.03883	341735-341751	ttttatgatctataa	A2G07_01670	DR2381	phenylacetic acid degradation bifunctional protein PaaZ	342368	-633
L	0.53436	0.03951	341762-341746	tcttattctattata	none				
L	0.48550	0.03706	341780-341764	tttttccaattcact	none				
R	0.62251	0.01384	479525-479541	tttgagcagcatcaca	a2G07_2310	drrnaa5s	5Sribosomal RNA	479553	*-28
L	0.65719	0.00916	479541-479525	tgtgatgctgctcaaa	none				
R	0.48301	0.03706	499479-499495	tgagaaatgaaaaaaa	none				
L	0.48428	0.03706	499495-499479	ttttttcatttctca	A2G07_02440	DR2228	hypothetical protein	499445	-50
R					A2G07_2745	DR2173	hypothetical protein	554738	-18
L	0.53508	0.03951	554736-554720	tgatcatgagcataaca	A2G07_2740	DR2174	leucine-tRNA synthetase	554453	-299
R					A2G07_03375	DR2050	TufA, Elongation factor Tu	662268	-57
L	0.50672	0.03216	662227-662211	tgaacactatatcaaaa	none				
R	0.50253	0.03290	699805-699821	tttgagaactttctca	A2G07_03605	DR2005	50S ribosomal protein L35	699895	-90
L	0.52656	0.02856	699821-699805	tgagaaagtctcaaaa	none				
R	0.50227	0.03290	791113-791129	tgtaatcacgtaata	A2G07_04050	DR1912	protein tyrosine phosphatase	791381	-268
L	0.51665	0.02971	791129-791113	tattactggtattaaca	A2G07_04045	DR1913	DNA gyrase subunit A	791012	-117
R	0.65643	0.00916	867669-887685	tgtagttttttcact	A2G07_04460	DR1828	hypothetical protein	867849	-180
L	0.59470	0.01778	867685-887669	agtgaaaaactaaca	none				

R	0.54131	0.03959	885832-885848	tttcaaaaggataaaa	A2G07_04550	DR1809	glycine dehydrogenase (aminomethyl-transferring)	885885	-53
R	0.56916	0.02178	898330-898346	tttgatcttgaaaaa	none				
L	0.57609	0.03118	898346-898330	ttttcaaagatcaaa	A2G07_04605	DR1797	transcription termination/antitermination protein NusA	898307	-39
R				none	A2G07_04775	DR1763	hypothetical protein	932712	-99
L	0.50916	0.03128	932629-932613	ttttcttttactcact	A2G07_04770	DR1764	glyoxalase	932456	-173
R					A2G07_04980	DR1722	hypothetical protein	975881	-24
L	0.53539	0.02746	975873	ttttatgcagacaaaa	none				
R	0.53780	0.03951	1089567-1089583	tattcaattattctaa	A2G07_05530	DR1612	Predicted regulator of Ras-like GTPase activity	1089649	-82
L					A2G07_05525	DR1613	ArsR family transcriptional regulator	1089436	-147
R	0.73016	0.00419	1109937-1109953	tgtgaattattaacg	A2G07_05615	DR1594	hypothetical protein	1110022	-85
L	0.66160	0.00901	1109953-1109937	cgttaaataattcaca	A2G07_05610	DR1595	6-phosphogluconate dehydrogenase	1109824	-129
R	0.53913	0.02687	1130740-1130756	ttatatgaggatcaca	A2G07_05725	DR1571	peptide ABCtransporter	1130880	-140
L	0.57153	0.02126	1130756-1130740	tgtagctctatataa	A2G07_05720	DR1572	DNA helicase UvrD ₂	1130528	-228
R	0.66189	0.00901	1158636-1158652	tgtaagtttttaaca	A2G07_05845	DR1546	superoxide dismutase	1158825	-189
L	0.64196	0.01237	1158652-1158636	tgtaaaaaacttaca	A2G07_05840	DR1548	hypothetical protein	1158537	-115
R	0.54575	0.03795	1338828-1338844	tatttttatatgaaa	none				
L	0.55422	0.03483	1338844-1338828	tttcataaaaaata	A2G07_06660	DR1375	alpha-amylase	1338773	-71
R	0.54619	0.03772	1343632-1343648	ttagaaaaatttatat	A2G07_06680	DR1371	hypothetical protein	1343665	-33
R	0.49759	0.03430	1343636-1343652	aaaaatttatataaa	A2G07_06680	DR1371	hypothetical protein	1343665	-29
L	0.55108	0.03679	1343647-1343631	tataaattttctaaa	A2G07_06675	DR1372	Water stress and hypersensitive response	1343609	-38
L	0.56230	0.03366	1343652-1343636	tttaataaaattttt	A2G07_06675	DR1372	Water stress and hypersensitive response	1343609	-43
R	0.62018	0.01431	1389214-1389230	ttgaaaattttctca	A2G07_06900	DR1324	transporter	1389409	-195
L	0.62793	0.01362	1389230-1389214	tgagaaaattttcaaa	A2G07_06895	DR1325	peptidase	1389077	-153
R	0.79022	0.00135	1519257-1519273	tgagaatttttcaca	none				
L	0.75897	0.00267	1519273-1519257	tgtaaaataattctca	A2G07_07555	DR1193	hypothetical protein	1519144	-129

R	0.58988	0.01832	1726927-1726943	aatgatttgcctcaa	none				
L	0.57050	0.02178	1726943-1726927	tttgagcaaaatcatt	A2G07_08600	DR0980	amino acid dehydrogenase	1726895	-48
R	0.60769	0.01585	1763588-1763604	cgatgaatacttcaca	A2G07_08760	DR0950	NADH dehydrogenase	1763617	-29
L	0.62266	0.01384	1763604-1763588	tgtaaagtattcacg	none				
R	0.56084	0.02293	1966428-1966444	tgatgaataagaact	A2G07_09790	DR0743	DNA-binding response regulator	1966494	-66
L	0.53658	0.02746	1966444-1966428	agttctattcatcaca	A2G07_09785	DR0744	two-component sensor histidine kinase	1966212	-232
R	0.67199	0.00833	1994176-1994192	tgtaaaagttttaaca	A2G07_09925	DR0713	lipopolysaccharide glycosyltransferase	1994360	-184
L	0.65288	0.00946	1994192-1994176	tgtaaaaaacttaca	none				
R				none	A2G07_09950	DR0708	hypothetical protein	2000243	-123
L	0.63392	0.01323	2000136-2000120	tgtaaaaacttaact	none				
R	0.63758	0.01289	2035350-2035366	tatgagatttctcaca	none				
L	0.60969	0.01529	2035366-2035350	tgtagaaaatctcata	A2G07_10075	DR0685	hypothetical protein	2035079	-287
R	0.58392	0.01911	2054088-2054104	tttgattttttcteta	A2G07_10185	DR0659	disulfide bond formation protein DsbA	2054125	-37
L	0.53183	0.02795	2054104-2054088	tagaaaataaatcaaaa	none				
R	0.58589	0.01911	2072976-2072992	ttttttttctcgca	A2G07_10290	DR0638	hypothetical protein	2073194	-218
L	0.54028	0.02687	2072992-2072976	tcgagaaaaataaaa	none				
R	0.49952	0.03290	2103527-2103543	tttggtttataaaata	none				
L	0.46940	0.03971	2103543-2103527	tattttataaaccaaaa	A2G07_10430	DR0611	alkane 1-monoxygenase	2103510	-33
R	0.53150	0.02795	2198232-2198248	tgtagaacacttaaaag	A2G07_10885	DR0526	hypothetical protein	2198274	-42
L	0.51854	0.02971	2198248-2198232	ctttaagtgtttcaca	none				
R	0.53864	0.03959	2261810-2261836	tttgatgatctaaact	A2G07_11200	DR0464	malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase	2262036	-226
R	0.57390	0.02126	2301859-2301875	tgttattctgttctaa	A2G07_11420	DR0423	DNA damage response protein DdrA	2301885	-26
L	0.54932	0.02521	2301875-2301859	ttagaacagaataaca	A2G07_11415	DR0424	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	2301687	-188
L	0.54703	0.02521	2360836-2360820	tatgatcaattcatc	A2G07_11715	DR0364	peptide ABC transporter permease	2360835	1
R	0.65719	0.00916	2471217-2471233	tgatgctgctcaaaa	none				
L	0.62251	0.01384	2471233-2471217	tttgagcagcatcaca	a2G07_12270	drrrnac5s	5Sribosomal RNA	2471206	*-27

R	0.58172	0.01957	2563641-2563657	tgaatccacatcaaa	none				
L	0.60549	0.01585	2563657-2563641	tttgatgtggattca	A2G07_12730	DR0160	hypothetical protein	2563554	-103
R	0.55626	0.03552	2565534-2565550	tattctttttatca	A2G07_12745		hypothetical protein	2565668	-134
L				none	A2G07_12740	DR0158	branched-chain amino acid dehydrogenase	2565361	-189
R				none	A2G07_12890	DR0125	acetyltransferase	2601160	-166
L	0.51433	0.03047	2601010-2600994	tttctgaaattcact					
R	0.48513	0.03706	2624178-2624194	tgcaatgacataaaa	none				
L				none	A2G07_13010	DR0100	single-stranded DNA-binding protein	2624078	-116

Chromosome 2

R	0.53266	0.02665	35320-35336	ttgacaaattgcaca	A2G07_13270	DRA0320	urea ABC transporter substrate-binding protein	35370	-50
L	0.59835	0.01720	35336-35320	tgtgcaattgtcaaa	A2G07_13265	DRA0319	Urease subunit beta/gamma	35159	-177
R	0.65622	0.00857	78030-78046	tgtgaagtccttaca	A2G07_13430	DRA0350	histidine kinase	78193	-163
L	0.62689	0.01289	78046-78030	tgtaaaggacttcaca	none				
L	0.57944	0.01933	101793-101777	agtgctttattctca	A2G07_13515	DRA0368	glycosyl transferase	101655	-138
R	0.46495	0.03951	103555-103571	tttaagataaaaaca	A2G07_13525	DRA0001	chromosome partitioning protein ParA	104100	-545
L	0.49506	0.03319	103571-103555	tgtttttatcttaaa	A2G07_13520	DRA0369	hypothetical protein	103284	-287
R	0.59834	0.01720	167048-167064	tttaagcttatcaaa	none				
L	0.61107	0.01551	167064-167048	tttgataagctttaa	A2G07_13780	DRA0058	hypothetical protein	166951	-113
R				none	A2G07_14195	DRA0143	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	245916	-245
L	0.55090	0.02376	245687-245671	taagatttattcaaca	A2G07_14190	DRA0142	hypothetical protein	245650	-37
R	0.68933	0.00595	249055-249071	tatgaattacgtcaaa	A2G07_14210	DRA0146	catalase	249057	-2
R	0.51916	0.02893	267853-267869	ggttatgctattaca	A2G07_14305	DRA0165	hypothetical protein	268089	-236
R	0.67042	0.00791	392639-292655	tgtaatattttctct	A2G07_14810	DRA0271	sugar transporter	392721	-82
L	0.60816	0.01551	392655-392639	agagaaataaattaca	A2G07_14805	DRA0270	adenosine deaminase	392496	-159

R				none	A2G07_14845	DRA0279	hypothetical protein	403390	-108
L	0.53254	0.03998	403298-403282	tttgatgagttttct	A2G07_14840	DRA0277	malate synthase A	402618	-320
R	0.53724	0.03951	409669-409685	tgtaaagctttaa	A2G07_14865	DRA0284	hypothetical protein	409756	-87

Megaplasmid MP1

R	0.71929	0.00546	2121-2137	ggtgatattatcaaa	A2G07_14975		hypothetical protein	2627	-506
L	0.70187	0.00588	2137-2121	ttgataaatcacc	none				
L	0.60027	0.01754	38137-38121	tgtgatgaaagtctct	A2G07_15105	DRB0044	diguanylate cyclase	38105	-32
R	0.55777	0.03265	89514-89530	ttttatctttaag	A2G07_15320	DRB0145	Plasmid replication initiator protein	89564	-50
L	0.54862	0.03503	89530-89514	cttaaaagataaaaa	A2G07_15315	DRB0001	ParA family chromosome partitioning ATPase	88922	-608
R	0.59627	0.01754	89523-89539	ttttaagtatttaaaa	A2G07_15320	DRB0145	Plasmid replication initiator protein	89564	-41
L	0.56001	0.02251	89539-89523	tttaataacttaaaa	A2G07_15315	DRB0001	ParA family chromosome partitioning ATPase	88922	-617
R	0.54732	0.02462	127185	tgtgttttaaaactca	A2G07_15460	DRB0118	hypothetical protein	127329	-144
L	0.54911	0.02462	127201	tgagttttaaacaca	none				

FITBAR analysis performed on the completely sequenced *D. radiodurans* genome (5) using the 176 putative DdrI binding sites listed in Table S1.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Shimada T, Fujita N, Yamamoto K, Ishihama A. 2011. Novel roles of cAMP receptor protein (CRP) in regulation of transport and metabolism of carbon sources. *PLoS One* 6:e20081.
2. Bai G, McCue LA, McDonough KA. 2005. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Rv3676 (CRPMt), a cyclic AMP receptor protein-like DNA binding protein. *J Bacteriol* 187:7795-7804.
3. Kohl TA, Baumbach J, Jungwirth B, Puhler A, Tauch A. 2008. The GlxR regulon of the amino acid producer *Corynebacterium glutamicum*: *in silico* and *in vitro* detection of DNA binding sites of a global transcription regulator. *J Biotechnol* 135:340-350.
4. Redfield RJ, Cameron AD, Qian Q, Hinds J, Ali TR, Kroll JS, Langford PR. 2005. A novel CRP-dependent regulon controls expression of competence genes in *Haemophilus influenzae*. *J Mol Biol* 347:735-747.
5. Hua X, Hua Y. 2016. Improved Complete Genome Sequence of the Extremely Radioresistant Bacterium *Deinococcus radiodurans* R1 Obtained Using PacBio Single-Molecule Sequencing. *Genome Announc* 4.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES:

La régulation de l'expression des gènes est fondamentale pour s'adapter suite à des changements environnementaux. Chez les bactéries, les régulateurs transcriptionnels de la famille CRP/FNR sont considérés comme des acteurs importants pour détecter et répondre à un large spectre de signaux intracellulaires ou extracellulaires (Korner et al., 2003).

Chez *D. radiodurans*, le régulateur transcriptionnel DdrI possède les caractéristiques des protéines de la sous-famille CRP, avec un domaine effecteur de fixation à l'AMPc en N-terminal et un domaine de fixation à l'ADN en C-terminal. Le gène *ddrI* a été initialement identifié parmi les gènes de *D. radiodurans* induits, après exposition des cellules au rayonnement γ (induction d'un facteur 4 suite à une exposition de rayonnement γ à une dose de 3 kGy) (Tanaka et al., 2004).

Les études antérieures et notre travail ont permis de démontrer que le mutant de délétion $\Delta ddrI$ présente un phénotype pléiotrope, incluant de sévères défauts de croissance cellulaire en conditions standards, une sensibilité importante aux agents endommageant l'ADN (rayonnements γ , UV et mitomycine C) et au stress oxydant (peroxyde d'hydrogène et paraquat) (Dulermo et al., 2015; Meyer et al., 2018; Yang et al., 2016).

Un retard de la croissance cellulaire en conditions standards, a déjà été observé dans le mutant Δcrp^{Mt} chez *M. tuberculosis* (Bai et al., 2011) et dans le mutant $\Delta glxR$ chez *C. glutamicum* (Park et al., 2010). Chez *D. radiodurans*, nous avons montré que la protéine DdrI est fortement induite en phase stationnaire de croissance, d'une manière dépendante de DrRRA. L'analyse par microscopie à épifluorescence de la morphologie des cellules sauvages et du mutant $\Delta ddrI$, montre que l'absence de DdrI conduit à une augmentation importante, au cours de la phase de croissance, de structures composées de 8 cellules (en anglais: two-tetrads), suggérant que la protéine DdrI régule l'expression de gènes impliqués dans les dernières étapes de la division cellulaire. Des travaux antérieurs ont montré qu'une augmentation de la concentration en NaCl induit chez *D. radiodurans*, la formation de structures constituées de 8, 16 ou 32 cellules (Chou & Tan, 1991). Ces observations suggèrent que DdrI pourrait jouer un rôle dans l'homéostasie du NaCl. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions analyser la sensibilité du mutant $\Delta ddrI$ au choc salin. Parmi les gènes cibles potentiellement régulés par DdrI, de nombreux transporteurs des acides aminés, des carbohydrates ou des peptides (exemples: *dr0364*, *dr0980*, *dr1324*, *dr2265*, *dr2525*, *drA0271*) ont été identifiés dans le génome de *D. radiodurans* et un site cible potentiel de DdrI a été prédit en amont d'un gène

(dr1929) codant une aquaporine (position -38 par rapport à l'ATG), suggérant que DdrI pourrait jouer un rôle dans le contrôle de l'homéostasie du NaCl en régulant l'expression de ces gènes.

Ces analyses par microscopie à épifluorescence, ont également montré qu'en comparaison avec la souche sauvage, l'absence de DdrI entraîne une augmentation importante du nombre de cellules anucléées, au cours de la phase de croissance; suggérant que DdrI contrôle également l'expression de gènes impliqués dans la ségrégation des chromosomes. Nous avons par ailleurs, montré que la protéine DdrI est impliquée dans le maintien du mégaplasme MP1, 2 sites cibles potentiels de DdrI ont été prédits dans le mégaplasme MP1 [**Figure 7** de (Meyer et al., 2018)], en amont du gène (drB0145) codant une protéine impliquée dans l'initiation de la réplication de l'ADN et en amont d'un opéron constitué de 2 gènes (drB0001 et drB0002) impliqués dans la ségrégation des chromosomes. Ces résultats suggèrent que DdrI permet le maintien du mégaplasme MP1 en régulant l'expression des gènes drB0145, drB0001 et drB0002. Pour déterminer si DdrI contrôle directement l'expression de ces gènes, il faudrait réaliser des expériences de retard sur gel en incubant la protéine DdrI avec la région promotrice de ces gènes et comparer leur expression dans une souche sauvage et dans le mutant Δ drI, grâce à la construction de fusions transcriptionnelles ($P_{drB0145}::lacZ$ ou $P_{drB0001}::lacZ$) intégrées dans le génome de *D. radiodurans*, en remplacement d'un gène non essentiel situé dans les chromosomes I, II ou le plasmide CP1.

Les régulateurs de la sous-famille CRP ont la particularité de reconnaître des séquences d'ADN spécifiques, qui sont très conservées, même au sein d'espèces bactériennes éloignées phylogénétiquement, telles que *E. coli*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *M. tuberculosis*, *C. glutamicum* (**Figure 44**). L'alignement des séquences d'acides aminés des protéines CRP^{Ec} et DdrI montre que les 2 protéines partagent 25 % d'acides aminés identiques. Nous avons montré que l'expression de la CRP^{Ec}, exprimée à partir du plasmide p11559, dans le mutant Δ drI, permet de restaurer partiellement les défauts de croissance en conditions standards, la résistance au rayonnement UV, à la mitomycine C et au paraquat. Par ailleurs, nous avons montré que la protéine DdrI est impliquée dans le maintien dans la cellule hôte du plasmide p11559. Les défauts de maintien du plasmide p11559 dans les cellules privées de la protéine DdrI, sont partiellement supprimés quand la CRP^{Ec} est exprimée à partir de ce plasmide dans le mutant Δ drI, ce qui suggère que nous aurions peut-être eu une meilleure complémentation des différents phénotypes du mutant Δ drI, si le gène codant la CRP^{Ec} avait été exprimé à partir des chromosomes I, II ou du plasmide CP1.

Ces expériences de complémentation hétérologue, suggèrent que la CRP^{Ec} et DdrI reconnaissent des séquences d'ADN proches et sont capables de réguler l'expression de plusieurs gènes cibles communs, ce qui nous a permis de réaliser des prédictions in silico des gènes cibles potentiels de DdrI dans l'ensemble du génome de *D. radiodurans*. 115 sites potentiels de DdrI ont été identifiés dans le génome de *D. radiodurans* suggérant que DdrI régule l'expression d'une centaine de gènes, impliqués dans la réplication, la réparation de l'ADN, la réponse au stress oxydant et au choc thermique, la transduction de signal, le métabolisme et le transport des carbohydrates, la biosynthèse de la paroi cellulaire et le métabolisme des lipides.

Nous avons confirmé, par des expériences de retard sur gel, que la séquence consensus pseudopalindromique 5' TGTGA(N6)TCACA 3', déterminée à partir des 115 sites de fixation potentiels de DdrI, est spécifiquement fixée par DdrI et uniquement en présence d'AMPc.

Nous avons également montré que DdrI se fixe spécifiquement en présence d'AMPc, à un variant de cette séquence consensus, 5' TGTTAAAAAACTTACA 3', présente en amont de la séquence codante (position -189 par rapport à l'ATG) du gène *sodC*, codant une superoxyde dismutase. Le paraquat génère la production d'anions superoxydes qui sont convertis par des superoxydes dismutases en peroxyde d'hydrogène. La fixation spécifique de DdrI en amont du promoteur putatif de *sodC* suggère que DdrI pourrait activer la transcription de *sodC* en réponse au stress oxydant, ce qui pourrait en partie expliquer la sensibilité du mutant Δ ddrI au paraquat.

Chez de nombreuses bactéries (**Tableau 3**), l'interaction des facteurs de transcription de la sous-famille CRP avec l'AMPc est nécessaire à leur capacité à réguler l'expression de leurs gènes cibles. Il a été démontré chez *E. coli* que la fixation de l'AMPc au domaine N-terminal de la CRP^{Ec}, induit un changement conformationnel de la protéine, ce qui lui permet de se fixer spécifiquement à l'ADN (**Figure 38**) (Popovych et al., 2009; Sharma et al., 2009). DdrI possède 4 des 6 acides aminés essentiels pour la fixation de l'AMPc (Gly71, Glu72, Arg82 et Thr172) (Lee et al., 1994; Schultz & Matin, 1991; Yang et al., 2016) et nous avons montré que la présence d'AMPc est indispensable à la fixation spécifique de DdrI à l'ADN, suggérant que chez *D. radiodurans*, la protéine DdrI subit également un changement conformationnel qui active la protéine. Des expériences de digestion partielle de la protéine DdrI par la trypsine, en présence ou non d'AMPc, suivi de l'analyse des produits de digestion par SDS-PAGE, pourrait permettre de mettre en évidence ces réarrangements structuraux, comme cela a déjà été montré pour la protéine CRP^{Mt} chez *M. tuberculosis* (Bai et al., 2005).

Chez *D. radiodurans*, *ddrI* est le seul gène codant un régulateur transcriptionnel parmi les 25 gènes les plus induits, après traitement des cellules à un choc thermique de 5 min à 48°C (Schmid et al., 2005a). De plus, nous avons montré que le mutant $\Delta ddrI$ est 1000 fois plus sensible que la souche sauvage à l'élévation de la température, lorsque les cellules sont cultivées à 37°C, ce qui suggère que la protéine DdrI joue un rôle crucial dans la réponse au choc thermique chez *D. radiodurans*. Nos analyses par western-immunoblot ont confirmé que la protéine DdrI est fortement induite après un choc thermique (48°C pendant 30 min) et ont montré que cette induction est dépendante du régulateur de réponse DrRRA. Une étude antérieure a montré que la protéine DrRRA se fixe spécifiquement à la région promotrice de *DdrI* (Wang et al., 2008). D'après l'ensemble de ces données, nous proposons le modèle suivant pour la régulation de la réponse au choc thermique chez *D. radiodurans* (illustré dans la **Figure 45**) : l'élévation de la température est perçue par une histidine kinase, encore inconnue, qui s'autophosphoryle puis transfère le groupement phosphate au régulateur de réponse DrRRA, qui devient alors fonctionnel et induit l'expression du gène *ddrI*, qui lui-même induit l'expression de ses gènes cibles.

Afin de mieux comprendre la thermosensibilité du mutant $\Delta ddrI$, des expériences de RT-qPCR ont été réalisées pour quantifier, l'induction de l'expression de plusieurs gènes de réponse au choc thermique dans la souche sauvage et le mutant $\Delta ddrI$. Nous avons ainsi montré qu'après un choc thermique de 5 min à 48°C, la protéine DdrI est impliquée dans l'induction de l'expression de gènes codant 3 protéases (*clpB*, *lon1*, *lon2*), 5 protéines du métabolisme de l'ADN (*dnaN*, *mutT*, *ddrF*, *gyrA*, *uvrD2*), 1 protéine du métabolisme des lipides (*dr2381*), 1 inhibiteur de la traduction (*raiA*), 3 protéines du métabolisme/transport des carbohydrates (*dr1571*, *dr0561*, *drA0319*), 2 protéines impliquées dans la transposition (*dr1651* et *dr1652*) et 1 protéine hypothétique (*drA0369*). Les gènes dont le site cible potentiel de DdrI a été prédit en amont de leur séquence codante (*dnaN*, *mutT*, *ddrF*, *gyrA*, *uvrD2*, *dr1571*, *lon1*, *dr2381*, *drA0319* et *drA0369*) sont supposés être directement contrôlés par DdrI. Parmi les gènes cibles potentiels de DdrI, 3 codent des régulateurs transcriptionnels ou des régulateurs de réponse (*dr0743*, *dr2556*, *dr2629*), suggérant l'existence d'une ou plusieurs voies de régulation complexes, dans lesquelles DdrI régule de manière indirecte, l'expression de plusieurs gènes de réponse au choc thermique (*clpB*, *lon2*, *raiA*, *dr0561*, *dr1651*, *dr1652*). Cependant des travaux antérieurs (Yang et al., 2016) ont montré, que DdrI se fixait à la région promotrice des gènes *lon1* et *lon2* et nous savons que les protéines de la sous-famille CRP sont capables de reconnaître des séquences d'ADN relativement divergentes (**Figure 44** et **Figure 3A de (Meyer et al., 2018)**). Il est donc possible que les

prédictions *in silico* des gènes cibles de DdrI ne nous aient pas permis d'identifier l'ensemble des sites cibles de DdrI. C'est pourquoi, il serait intéressant de réaliser des expériences de ChiP-seq avec des cellules ayant subi ou non un choc thermique (30 min à 48°C), afin d'avoir une vision plus exhaustive de l'ensemble des gènes directement contrôlés par DdrI après un choc thermique.

La régulation de l'expression des gènes du choc thermique est complexe et implique des voies diverses chez les procaryotes. Elle inclut généralement un contrôle positif par l'intermédiaire des facteurs σ alternatifs qui dirigent spécifiquement la machinerie de transcription vers les promoteurs des gènes du choc thermique et/ou un contrôle négatif par l'action de répresseurs transcriptionnels, qui répriment l'expression des gènes du choc thermique en conditions standards (Roncarati & Scarlato, 2017). Chez *E. coli*, la réponse au choc thermique est gouvernée par 2 facteurs σ alternatifs, le facteur σ^{32} et le facteur σ^E de la sous-famille ECF (pour extracytoplasmique function) (Schumann, 2016) (**Figure 45**). L'augmentation rapide et transitoire de l'expression des gènes de choc thermique est directement liée au taux de σ^{32} actif dans la cellule. Le facteur σ^{32} est normalement présent en très faible quantité, mais son expression, son activité et sa stabilité augmentent rapidement après un choc thermique, grâce à la combinaison de plusieurs mécanismes différents (**Figure 45**) (Schumann, 2016). Il a notamment été démontré que le complexe formé par la CRP^{Ec} de *E. coli* et l'AMPc induit *in vitro* et *in vivo* la transcription du gène *rpoH* codant le facteur σ^{32} (Nagai et al., 1990).

Chez *B. subtilis*, la réponse au choc thermique est contrôlée par un réseau de régulation complexe constitué d'au moins 2 répresseurs transcriptionnels HrcA et CtsR, le facteur sigma alternatif SigB et le système à deux composants CssS/CssR (Schumann, 2016) (**Figure 45**).

Chez *D. radiodurans*, des études antérieures ont montré que la réponse au choc thermique met également en jeu 2 autres acteurs, le facteur sigma alternatif de la sous-famille ECF Sig1 et le répresseur transcriptionnel HspR qui, en conditions standards, réprime l'expression de gènes codant des protéines chaperonnes ou des protéases en se fixant à la séquence consensus HAIR (CTTGAGTN7ACTCAAG), située en amont de leur séquence codante (Schmid et al., 2005a; Schmid et al., 2005b; Schmid & Lidstrom, 2002).

Bien que *D. radiodurans* possède plusieurs gènes codant des protéines régulatrices déjà caractérisées chez d'autres bactéries (exemple de *lexA1/lexA2*, *oxyR/oxyR₂*), la réponse au stress chez *D. radiodurans* semble être relativement différente des paradigmes établis chez *E. coli* ou *B. subtilis*. Ce travail met en évidence que chez *D. radiodurans*, l'implication dans la réponse au choc thermique, d'une voie de régulation complexe incluant plusieurs acteurs dont

le régulateur de réponse DrRRA et DdrI en tant qu'activateur transcriptionnel, est également une situation originale comparée à ce qui a été montré chez d'autres bactéries telles que *E. coli* et *B. subtilis*.

Pour conclure, les études antérieures et notre travail montrent que le régulateur transcriptionnel DdrI est un acteur majeur dans la physiologie et la réponse à des stress variés chez *D. radiodurans* (Yang et al., 2016). Les expériences de Chip-seq permettront de déterminer l'ensemble des cibles directes de DdrI après un choc thermique et d'obtenir une vision plus précise des éventuels réseaux de régulation complexes impliqués dans la mise en place de la réponse au choc thermique chez *D. radiodurans*. Chez *E. coli*, des expériences de ChiP-seq ont mis en évidence que la CRP^{Ec} se fixe également à de nombreuses régions intragéniques distribuées tout le long du chromosome, suggérant un rôle en tant qu'organisateur du chromosome ou protéine NAP (Grainger et al., 2005). Il sera donc intéressant de déterminer si DdrI joue également un rôle dans la structuration du génome en plus de celui de régulateur transcriptionnel.

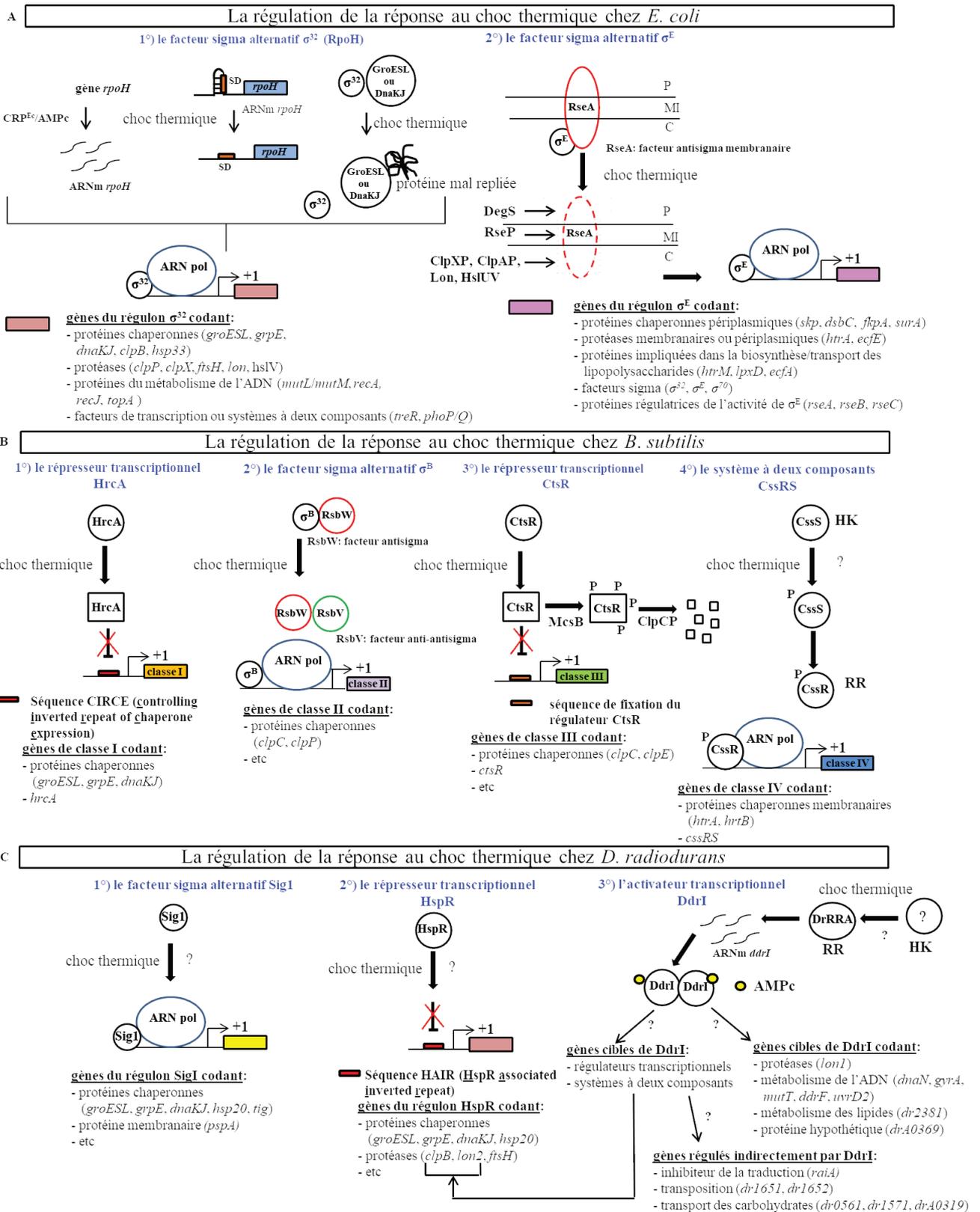


Figure 45: Régulation de la réponse au choc thermique chez *E. coli*, *B. subtilis* et *D. radiodurans*.

– A) Chez *E. coli*, 1°) après un choc thermique, le complexe CRP^{Ec}-AMPc induit la transcription du gène *rpoH* codant le facteur σ^{32} (Nagai et al., 1990). A 37°C, l'ARNm

rpoH forme une structure secondaire qui séquestre la séquence Shine-Dalgarno (SD, rectangle orange) et inhibe la traduction de l'ARNm rpoH. Après un choc thermique (42°C) la séquence SD est libérée, favorisant ainsi la traduction efficace du facteur σ^{32} (Schumann, 2016). En conditions standards, les protéines chaperonnes GroESL ou DnaKJ fixent le facteur σ^{32} et inhibent son activité. Après une élévation de la température, les protéines chaperonnes sont titrées par les protéines cellulaires mal repliées, libérant ainsi le facteur σ^{32} qui induit l'expression de son régulon (Guisbert et al., 2004; Straus, Walter & Gross, 1987). 2°) A 30°C, σ^E est séquestré à la membrane cytoplasmique par le facteur antisigma membranaire RseA. Après un choc thermique, les domaines périplasmique, transmembranaire et cytoplasmique de RseA sont respectivement dégradés par les protéases membranaires DegS et RseP et une des 4 protéases cytosoliques (ClpXP, ClpAP, Lon, HslUV), ce qui libère le facteur σ^E et permet l'induction de l'expression du régulon σ^E (Chaba et al., 2007; Walsh et al., 2003). P: périplasme, MI: membrane interne, C: cytoplasme.

- B) Chez *B. subtilis*, 1°) En conditions standards, HrcA réprime l'expression des gènes dnaKJ, grpE et groES en se fixant à la séquence d'ADN, appelée CIRCE (pour controlling inverted repeat of chaperone expression, rectangle rouge) située dans leur région promotrice (Zuber & Schumann, 1994). Après une élévation de la température (42°C), le répresseur HrcA subit un changement conformationnel qui entraîne sa dissociation de l'ADN et permet ainsi l'induction de l'expression des gènes contrôlés par HrcA (gènes de classe I). 2°) A 30°C, SigB est séquestré par le facteur antisigma RsbW, après une élévation de la température, le facteur anti-antisigma RsbV fixe le facteur antisigma RsbW et permet la libération du facteur sigma σ^B et l'induction du régulon σ^B (gènes de classe II) (Dufour & Haldenwang, 1994). 3°) En conditions standards, le répresseur CtsR (class three stress gene repressor) réprime l'expression des gènes de classe III (Derre, Rapoport & Msadek, 2000). Après un choc thermique (42°C), CtsR subit un changement conformationnel, ce qui l'inactive et provoque sa dissociation de l'ADN (Derre et al., 2000). La protéine kinase McsB phosphoryle et guide CtsR vers la protéase ClpCP pour provoquer sa dégradation et permettre ainsi la dérégulation efficace du régulon des gènes de classe III (Elsholz et al., 2011; Fuhrmann et al., 2009; Kirstein et al., 2007; Kirstein et al., 2005). 4°) Le système à deux composants CsrRS (pour control of secretion stress regulator and sensor) est le 4^{ème} mécanisme impliqué dans la réponse au choc thermique chez *B. subtilis* (Westers et al., 2006). Après une élévation de la température (48°C), l'histidine kinase (HK) CsrS, par un mécanisme encore inconnu, s'autophosphoryle, puis transfère le groupement phosphate au régulateur de réponse (RR) CsrR, qui active ensuite la transcription de l'opéron csrRS et des gènes htrA et htrB codant des protéines chaperonnes-protéases localisées à la surface externe de la membrane cytoplasmique, qui sont impliquées dans le repliement ou la dégradation des protéines de l'enveloppe cellulaire (Darmon et al., 2002; Hyyrylainen et al., 2001; Noone et al., 2012).

- C) Chez *D. radiodurans*, 1°) après un choc thermique à 48°C, le facteur sigma alternatif SigI induit l'expression des gènes codant des protéines chaperonnes, la protéine membranaire PspA (phage shock protein A) dont l'homologue chez *E. coli* est impliqué dans le maintien de l'intégrité de la membrane externe après des stress variés (Kleerebezem, Crielaard & Tommassen, 1996), le facteur Tig (trigger factor), une protéine chaperonne impliquée dans le repliement correct des polypeptides émergeant du ribosome etc (Deuerling et al., 1999; Schmid et al., 2005a; Schmid & Lidstrom, 2002). 2°) En conditions standards, le répresseur transcriptionnel HspR réprime l'expression des gènes codant des protéases ou des protéines chaperonnes en se fixant spécifiquement

à la séquence consensus HAIR (HspR-associated inverted repeat, rectangle rouge), située dans leur région promotrice (Schmid et al., 2005b). 3°) Après un choc thermique (48°C), une histidine kinase (HK) encore inconnue, active le régulateur de réponse DrRRA, qui induit l'expression de DdrI qui lui-même induit l'expression de gènes codant 3 protéases, 5 protéines du métabolisme de l'ADN, 1 protéine du métabolisme des lipides, 1 inhibiteur de la traduction, 3 protéines du métabolisme/transport des carbohydrates, 2 protéines impliquées dans la transposition et 1 protéine hypothétique. Un contrôle direct de DdrI est suspecté dans le cas où un site cible potentiel de DdrI est présent en amont de leur séquence codante (dnaN, mutT, ddrF, gyrA, uvrD2, dr1571, lon1, dr2381, drA0319 et drA0369). DdrI régule également l'expression de 3 régulateurs transcriptionnels ou régulateurs de réponse, suggérant que DdrI régule également l'expression de nombreux gènes de manière indirecte (clpB, lon2, raiA, dr0561, dr1651 et dr1652).

Chapitre 2:

L'absence de la protéine RecN, supprime la sensibilité aux agents endommageant l'ADN du mutant Δ pprA chez la bactérie radiorésistante *Deinococcus radiodurans*.

PROBLEMATIQUE:

Les études antérieures ont montré que la protéine PprA, une protéine spécifique des Deinococcaceae, joue un rôle clé dans la radiorésistance de *D. radiodurans*. En effet, la délétion du gène *pprA* sensibilise fortement *D. radiodurans* à l'exposition aux agents endommageant l'ADN (rayonnements γ , UV, mitomycine C) (Devigne et al.; Tanaka et al., 2004) et des analyses de la morphologie des cellules par microscopie à épifluorescence, montrent que 7h après exposition au rayonnement γ (3,8 kGy), 90% des cellules du mutant Δ *pprA* sont anucléées ou présentent des défauts de ségrégation de l'ADN, suggérant que la protéine PprA, joue un rôle important dans la ségrégation des chromosomes après exposition des cellules au rayonnement γ (Devigne et al., 2013). De plus, après exposition au rayonnement γ (3.8 kGy), la protéine PprA-HA est localisée au niveau du septum de division puis apparaît sous forme d'un fin filament reliant les cellules filles (**Figure 27**). Il a été montré que PprA interagit avec l'ADN gyrase et stimule in vitro l'activité de décaténation de l'ADN gyrase (Devigne et al., 2016). L'ensemble de ces données suggère que PprA, via son interaction physique et fonctionnelle avec l'ADN gyrase, est impliquée dans la ségrégation des chromosomes après exposition des cellules au rayonnement γ .

Chez les bactéries telles que *E. coli* et *B. subtilis*, les protéines de la famille SMC (pour structural maintenance of chromosome) jouent un rôle important dans l'organisation et la dynamique des chromosomes telles que la condensation du nucléoïde, la cohésion des chromatides sœurs et la ségrégation des chromosomes (Graumann & Knust, 2009).

D. radiodurans possède 3 protéines de la famille SMC : SMC, SbcC et RecN. Afin d'étudier les interactions génétiques possibles entre PprA et les protéines de la famille SMC, les doubles mutants Δ *pprA* Δ *smc*, Δ *pprA* Δ *sbcC* et Δ *pprA* Δ *recN* ont été construits et caractérisés. Alors que les doubles mutants Δ *pprA* Δ *smc* et Δ *pprA* Δ *sbcC* augmentent modérément la sensibilité du simple mutant Δ *pprA*, de manière intéressante, la délétion du gène *recN* supprime le phénotype de sensibilité du mutant Δ *pprA* aux rayonnements γ , UV, à la mitomycine C ou aux inhibiteurs de l'ADN gyrase (acide nalidixique et novobiocine). L'absence de RecN supprime également les défauts de ségrégation observés dans les cellules du mutant Δ *pprA* après exposition au rayonnement γ . Nous avons donc essayé de comprendre pourquoi l'absence de la protéine RecN supprimait l'ensemble des phénotypes des cellules

dépourvues de PprA et l'article suivant (en préparation) propose un modèle du rôle des protéines RecN et PprA dans la réparation de l'ADN chez *D. radiodurans*.

La structuration de l'ADN au sein de la cellule garantit l'intégrité du chromosome et sa compaction mais également l'accessibilité des enzymes, notamment les ADN ou ARN polymérase, afin de réaliser les réactions nécessaires à la viabilité de la cellule: réplication, transcription, recombinaison, ségrégation des chromosomes. Chez les bactéries, cette structuration du chromosome implique la présence des ADN topoisomérases et des protéines SMC.

1°) Les contraintes topologiques de l'ADN et le rôle des ADN topoisomérases

Chez tous les organismes vivants, la superhélicité de l'ADN peut être considérée comme une fonction biologique cruciale. Les ADN topoisomérases modulent le degré de surenroulement de l'ADN et permettent ainsi à la cellule d'effectuer les réactions indispensables à sa croissance. En effet, la plupart des mécanismes biologiques fondamentaux (réplication, transcription ou réparation de l'ADN, condensation/décondensation de l'ADN et ségrégation des chromosomes) induisent de nombreuses contraintes topologiques et les ADN topoisomérases, de par leurs activités, sont impliquées dans la résolution de ces contraintes topologiques (Champoux, 2001).

La double hélice de l'ADN s'enroule autour d'un axe hélicoïdal, générant des supertours qui lui permet d'adopter une structure compacte. L'état thermodynamique le plus stable pour une molécule d'ADN circulaire est l'état totalement relâché, l'introduction de supertours négatifs dans l'ADN facilite l'ouverture de la double hélice de l'ADN, ce qui est essentiel pour la réplication, la transcription et la recombinaison de l'ADN. A l'inverse, l'introduction de supertours positifs dans l'ADN stabilise la double hélice et empêche son ouverture (Hsieh & Wang, 1975). Les ADN topoisomérases ont la capacité d'introduire ou de supprimer des supertours dans l'ADN et/ou interviennent dans la caténation/décaténation des chromosomes.

Les ADN topoisomérases ont une structure en forme de pince, elles contrôlent les variations du surenroulement dans l'ADN, en introduisant des coupures transitoires de l'ADN et en catalysant le passage de l'ADN à travers ces coupures avant de les refermer. Les ADN topoisomérases utilisent un résidu tyrosine pour rompre la liaison phosphoester de l'ADN. Suivant leur mode de coupure, les ADN topoisomérases sont classées en deux groupes: les ADN topoisomérases de type I et de type II, chacune divisées en 2 familles A et B. Les ADN

topoisomérases de type IA et IB diffèrent par la liaison formée entre la tyrosine catalytique et l'ADN, alors que les ADN topoisomérases de type II diffèrent par leur structure tridimensionnelle. Les ADN topoisomérases de type I introduisent une coupure transitoire simple brin, alors que les ADN topoisomérases de type II génèrent une coupure double brin de l'ADN.

Lors de l'hydrolyse d'un brin de l'ADN via une réaction de trans-estérification, le groupement tyrosine des ADN topoisomérases de type I forme une liaison covalente avec l'extrémité 5' (cas des topo IA) ou 3' phosphate (cas des Topo IB) du brin hydrolysé, puis ces enzymes transfèrent l'autre brin à travers la coupure (cas des Topo IA) ou effectue une ou plusieurs rotations autour du brin intact (cas des Topo IB) puis referment la coupure pour obtenir un ADN circulaire relâché (**Figure 46**).

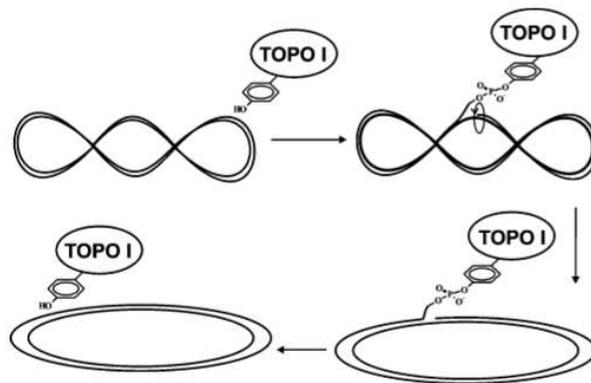


Figure 46: Modèle d'action des ADN topoisomérases de type I sur le relâchement de l'ADN (d'après (Bugreev & Nevinsky, 2009)).

Les ADN topoisomérases de type II sont des enzymes ATP dépendantes qui clivent les deux brins d'ADN et transfèrent la double hélice d'ADN, provenant de la même molécule, ou d'une autre, à travers la coupure (**Figure 47**), elles possèdent des activités de relâchement de l'ADN, de caténation/décaténation, et sont capables d'introduire des supertours dans l'ADN.

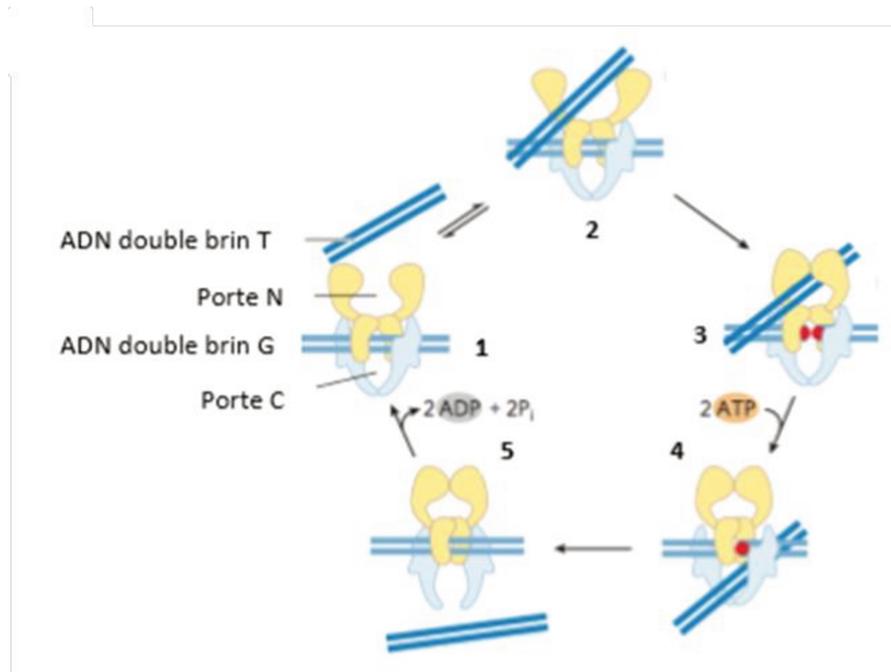


Figure 47: Représentation schématique de l'introduction de supertours dans l'ADN, réalisée par les ADN topoisomérases de type IIA. 1) Fixation de l'ADN double brin G par l'ADN topoisomérase, 2) entrée de l'ADN double brin T par la porte N, 3) fermeture de la porte N et coupure double brin de l'ADN G, 4) passage de l'ADN double brin T au travers de la coupure de l'ADN double brin G, 5) relargage de l'ADN double brin T par la porte C et ligation de l'ADN double brin G (d'après Lehninger, *Principles of Biochemistry*, 6th edition).

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. Lors de la réplication et de la transcription de l'ADN, les ADN et ARN polymérase se déplacent sur l'ADN en créant des « bulles » d'ADN simple brin qui provoquent la séparation locale des 2 brins de la double hélice d'ADN (Liu & Wang, 1987). Cette ouverture de la double hélice de l'ADN, génère 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 48**). Les ADN topoisomérases résolvent alors ces contraintes topologiques pour permettre la progression des fourches de réplication et de la « bulle » de transcription, en relâchant 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 sont impliquées dans la résolution des caténanes issus de la réplication ou de la recombinaison pour permettre une ségrégation correcte des chromosomes dans les cellules filles (Wang, 1985).

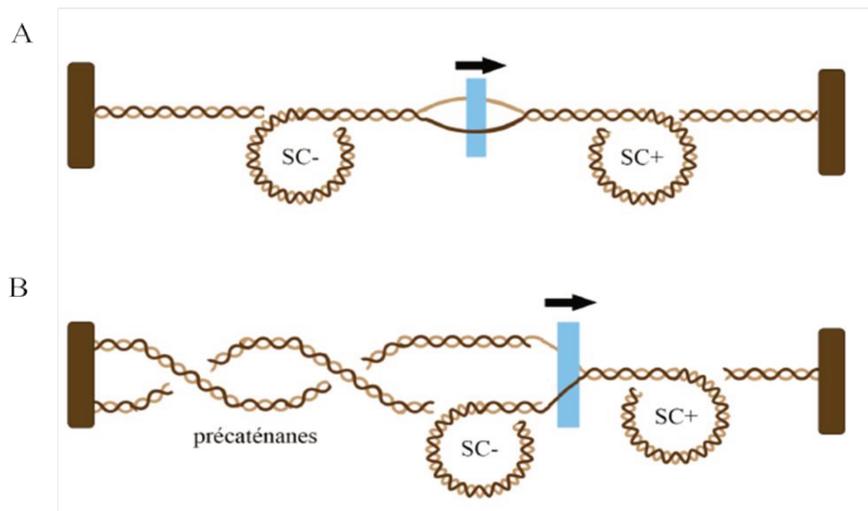


Figure 48: Modèle des contraintes topologiques générées lors la transcription et la réplication de l'ADN. A) La transcription de l'ADN introduit respectivement des supertours négatifs (-) et positifs (+) en amont et en aval de la machinerie de transcription. B) Lors de la réplication de l'ADN, la progression des fourches de réplication le long du chromosome crée des supertours positifs (+) de l'ADN en aval de la fourche de réplication et des supertours négatifs (-) de l'ADN ainsi que la formation de structure appelée précaténane en amont de la fourche de réplication (d'après la thèse d'Emmanuelle Gigant: la cohésion des chromatides sœurs: chez *E. coli*).

E. coli possède 4 ADN topoisomérases qui permettent de maintenir la topologie de l'ADN et/ou contrôler les différents processus cellulaires liés au métabolisme de l'ADN: 2 ADN topoisomérases de type I, l'ADN topoisomérase I (aussi appelée protéine ω) codée par *topA* et l'ADN topoisomérase III codée par *topB*; et 2 ADN topoisomérases de type II, l'ADN gyrase codée par *gyrA* et *gyrB* et l'ADN topoisomérase IV codée par *parC* et *parE*.

Les ADN topoisomérases IA et III sont des enzymes monomériques ATP indépendantes qui relâchent l'excès de surenroulement négatif (**Figure 49**).

- L'ADN topoisomérase IA est principalement impliquée dans le contrôle du surenroulement global de l'ADN (Gellert et al., 1983). Une diminution de l'expression de *topA*, augmente le niveau de surenroulement négatif de l'ADN et affecte la transcription de l'ADN (Sternglanz et al., 1981). L'ADN topoisomérase IA est impliquée dans le relâchement des supertours négatifs de l'ADN qui s'accumulent en amont de l'ARN polymérase au cours de la transcription (Kirkegaard & Wang, 1985). Une accumulation trop importante de supertours négatifs en amont de l'ARN polymérase entraînerait l'ouverture de la double hélice d'ADN et pourrait favoriser l'hybridation de l'ARNm nouvellement synthétisé avec le brin d'ADN matrice, ces structures sont appelées boucles R (Drolet et al., 2003). L'accumulation de ces boucles

R entraînerait soit une inhibition de la transcription en bloquant l'avancement de l'ARN polymérase, soit une inhibition de la synthèse protéique en entraînant la dégradation des ARNs synthétisés et hybridés sur le brin matrice.

- L'ADN topoisomérase III est quant à elle impliquée dans la réplication, la recombinaison et la ségrégation de l'ADN. In vitro, l'ADN topoisomérase III possède des activités de relâchement de l'ADN surenroulé négativement et de décaténation des intermédiaires de la réplication de l'ADN (**Figure 49**) (Srivenugopal, Lockshon & Morris, 1984; DiGate & Marians, 1989; Zechiedrich et al., 2000). Des expériences in vivo, suggèrent que l'ADN topoisomérase III est impliquée dans la recombinaison homologue et la ségrégation des chromosomes chez *E. coli* (Perez-Cheeks et al., 2012; Harmon, DiGate & Kowalczykowski, 1999; Suski & Marians, 2008). L'ADN topoisomérase III grâce à son activité de décaténation, est impliquée dans la résolution des hémicaténanes, générés lors de la dissolution des jonctions de Holliday lors de la recombinaison homologue (Harmon, DiGate & Kowalczykowski, 1999).
- L'ADN gyrase est une enzyme hétérotétramérique essentiel à la survie cellulaire chez *E. coli* (Drlica & Zhao, 1997), constituée de 2 sous-unités GyrA (domaine de fixation à l'ADN et site catalytique impliqué dans le clivage/refermeture de l'ADN) et de 2 sous-unités GyrB (sous-unité ATPasique). L'ADN gyrase est la seule enzyme à pouvoir introduire des supertours négatifs dans l'ADN (**Figure 49**) (Gellert et al., 1976). Avec l'ADN topoisomérase IA, elle contrôle le niveau de surenroulement global de l'ADN dans la cellule (Gellert et al., 1983). L'ADN gyrase est nécessaire à l'initiation de la réplication et de la transcription de l'ADN afin de créer un surenroulement négatif de l'ADN pour abaisser la quantité d'énergie requise pour l'ouverture de la double hélice de l'ADN (Espeli & Marians, 2004; Zechiedrich et al., 2000). De plus, l'ADN gyrase est essentielle pour convertir les supertours positifs, générés en aval des fourches de réplication de l'ADN et de la transcription, en supertours négatifs afin de permettre la progression de la fourche de réplication ou de transcription le long de l'ADN (Liu & Wang, 1987). Les inhibiteurs de l'ADN gyrase (acide nalidixique, novobiocine) induisent un relâchement de l'ADN (Zimmer, Storl & Storl, 1990). Des défauts de ségrégation dans un mutant thermosensible *gyrB* ont été constatés et des expériences in vitro montrent que l'ADN gyrase a également la capacité de décaténer de petites molécules d'ADN circulaires, ce qui suggère que l'ADN gyrase a un rôle dans la décaténation des chromosomes, après leurs

réplications et leurs ségrégations dans les cellules filles (**Figure 49**) (Steck & Drlica, 1984).

- L'ADN topoisomérase IV relâche in vitro l'ADN surenroulé positivement et négativement (**Figure 49**) mais ne peut pas introduire de surenroulement négatif comme l'ADN gyrase (Crisona et al., 2000; Hsieh et al., 2004). In vivo, L'ADN topoisomérase IV participe à la décaténation des chromosomes lors de la ségrégation des chromosomes (**Figure 49**) (Hiasa & Marians, 1996; Ullsperger & Cozzarelli, 1996). L'ADN topoisomérase IV interagit physiquement avec la protéine MukB de *E. coli* et cette dernière stimule l'activité de décaténation de l'ADN topoisomérase (Hayama & Marians, 2010). Il a également été montré que l'ADN topoisomérase IV interagit physiquement avec FtsK, une protéine impliquée dans la division cellulaire (Espeli, Lee & Marians, 2003).

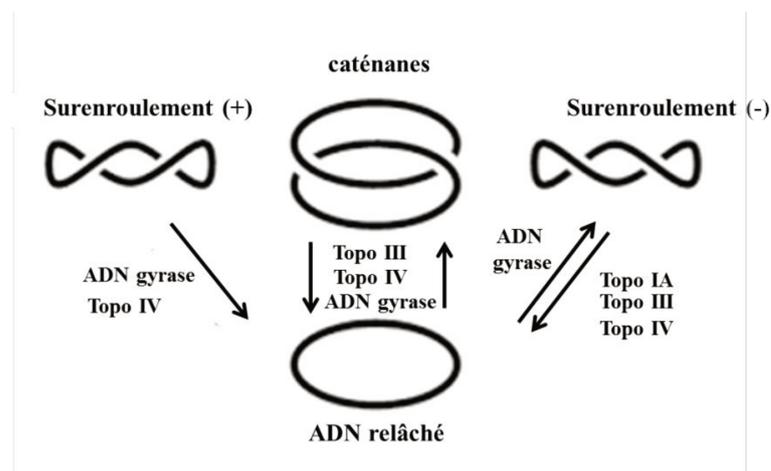


Figure 49: Résumé des différentes fonctions des ADN topoisomérases chez *E. coli*.

Chez *D. radiodurans*, 2 gènes codant les 2 sous-unités de l'ADN gyrase (*gyrA*: dr1913 et *gyrB*: dr0906) et un gène *topIA* (dr1374) codant pour l'ADN topoisomérase IA ont été identifiés dans son génome. En revanche, aucun homologue des gènes codant l'ADN topoisomérase III ni l'ADN topoisomérase IV n'a été identifié dans son génome. Un gène *topB* codant une ADN topoisomérase IB de type eucaryote, similaire à l'ADN topoisomérase du virus de la vaccine est également présent chez cette bactérie. Cette topoisomérase est retrouvée chez quelques bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium avium*, *Agrobacterium tumefaciens* (Krogh & Shuman, 2002; Makarova et al., 2001).

Les ADN topoisomérases de *D. radiodurans* sont pour le moment peu caractérisées. Il a été démontré *in vitro* que, l'ADN topoisomérase IB est capable de relâcher un ADN surenroulé négativement et positivement (Krogh & Shuman, 2002). L'ADN gyrase de *D. radiodurans* est essentielle à la viabilité cellulaire (Lecointe et al., 2004; Nguyen et al., 2009) et possède *in vitro* une activité de surenroulement négatif de l'ADN et une activité de décaténation qui est stimulée par la protéine PprA (Devigne et al., 2016).

2°) Les protéines de la famille SMC

A- Caractéristiques générales des protéines de la famille SMC

Les protéines de la famille SMC (pour structural maintenance of chromosome) et SMC-like sont conservées au sein des 3 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 et la réparation de l'ADN (Strunnikov, 2006).

Les domaines N et C-terminaux de ces protéines sont reliés par 2 longs domaines en superhélice « coiled-coil » qui se replient l'un sur l'autre de façon antiparallèle et sont reliés par une jonction appelée région charnière. L'association des domaines N et C terminaux forme un domaine « tête », le domaine N-terminal est composé d'un motif de liaison à l'ATP de type Walker A, impliqué dans la fixation de l'ATP et d'un motif de liaison à l'ADN. Le domaine C-terminal est composé d'un motif de liaison à l'ATP de type Walker B requis pour l'hydrolyse de l'ATP et d'un motif signature d'une activité ATPasique (Hirano & Hirano, 2002). Certaines protéines SMC sont associées à des protéines accessoires pour assurer leurs fonctions. La structure formée par les dimères de protéines SMC et leurs protéines accessoires est dépendante de l'ATP, les cycles répétés de fixation/hydrolyse d'ATP permettent aux protéines SMC d'avoir une conformation en « O » ou « V » (Hirano et al., 2001; Hirano & Hirano, 2002; Melby et al., 1998) (**Figure 50 B**).

Les protéines de la famille SMC sont réparties en 3 sous-familles: la sous-famille SMC/MukB, la sous-famille SbcC et la sous-famille RecN (Graumann & Knust, 2009).

B- Les protéines de la sous-famille SMC/MukB

1°) Structure des protéines SMC/MukB

Chez *B. subtilis* et *E. coli*, les protéines SMC/MukB forment des homodimères via la dimérisation de leurs domaines charnières (Hirano & Hirano, 2002) (**Figure 50 A**). La fixation de l'ATP au niveau des 2 domaines têtes, induit des petits changements conformationnels qui entraîne leur dimérisation (**Figure 50 B**), ce qui conduit à la formation d'une structure en anneau, qui est la forme active de la protéine SMC (Hirano & Hirano, 2002; Lammens, Schele & Hopfner, 2004).

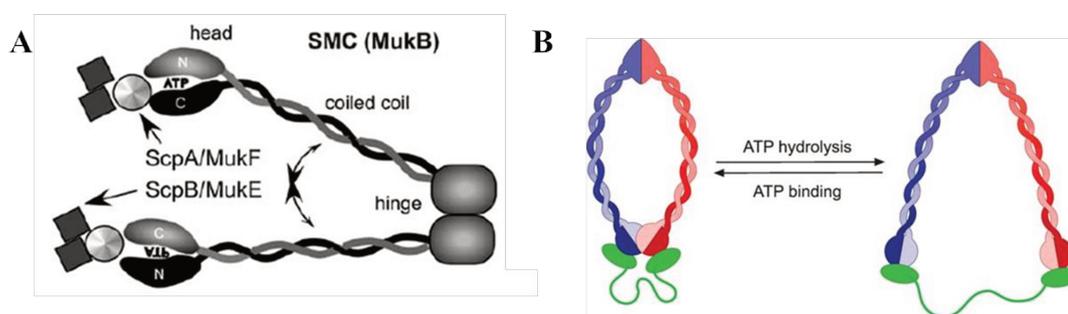


Figure 50: Structure des protéines SMC chez *B. subtilis* et MukB chez *E. coli*. A) Les protéines SMC et MukB forment des homodimères via la dimérisation de leurs domaines charnières (hinge) et forment respectivement un complexe avec les protéines accessoires ScpA/ ScpB et MukF/MukE (d'après (Graumann & Knust, 2009)). B) La fixation/hydrolyse de l'ATP modifie la structure des complexes formés par les protéines SMC et leurs protéines accessoires pour former une structure en anneau « O » ou en « V » (d'après (Nasmyth & Haering, 2005)).

Chez *B. subtilis*, des expériences de microscopie à force atomique ont montré que in vitro les protéines SMC purifiées, sont présentes sous forme dimérique, mais un nombre important de protéines forme une structure en rosette, constituée de 9 dimères de SMC. Dans ces superstructures (**Figure 51**), les domaines têtes forment le corps de la structure, les domaines « coiled-coil » sont dirigés vers l'extérieur et les domaines charnières sont situés sur le bord extérieur de la structure en rosette (Mascarenhas et al., 2005). Ces structures multimériques ont également été observées, par microscopie électronique, chez *E. coli* avec les protéines MukB (Matoba et al., 2005).

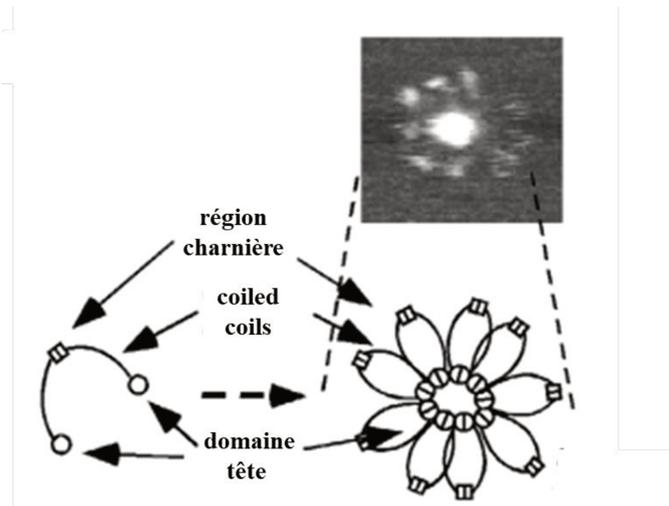


Figure 51: Structure en forme de rosette des dimères de SMC visualisée par microscopie à force atomique. Les domaines « tête » forment la partie centrale de la structure et les extensions coiled-coils à l'extérieur de la structure, pourraient servir à fixer les boucles d'ADN (adapté de (Mascarenhas et al., 2005)).

Les protéines SMC fixent l'ADN double brin et interagissent avec le chromosome de *B. subtilis* de manière non spécifique (Volkov et al., 2003). Il a été démontré qu'elles fixent l'ADN lorsqu'elles sont sous forme d'un anneau fermé, ou l'ADN est piégé entre les domaines coiled-coil (**Figure 50 B**), suggérant que l'ouverture/fermeture de la structure en anneau de SMC soit à la base du mode de fixation à l'ADN des protéines SMC (Gruber, Haering & Nasmyth, 2003; Volkov et al., 2003).

Les protéines SMC de *B. subtilis* et MukB de *E. coli* sont associées à 2 sous-unités protéiques accessoires appelées ScpA et ScpB (pour segregation and condensation protein A and B) chez *B. subtilis* et MukE et MukF (du japonais Mukaku, signifiant anucléée) chez *E. coli* (Mascarenhas et al., 2002; Soppa et al., 2002; Yamanaka et al., 1996). ScpA et MukF sont des membres de la famille des protéines « kleisins » (**Figure 50 A**) (Fennell-Fezzie et al., 2005; Schleiffer et al., 2003). In vitro, les protéines MukE et MukF forment un complexe protéique MukE₄MukF₂ (Petrushenko, Lai & Rybenkov, 2006) qui se fixe au domaine tête de la protéine MukB (Matoba et al., 2005). Chez *B. subtilis*, les protéines ScpA et ScpB s'assemblent également pour former un complexe, dont la stoechiométrie est inconnue, avec le domaine tête de la protéine SMC (Mascarenhas et al., 2005; Volkov et al., 2003). Les protéines ScpB et MukE interagissent avec les protéines SMC et MukB par l'intermédiaire des protéines ScpA et MukF (**Figure 50 A**) (Volkov et al., 2003; Yamazoe et al., 1999).

2°) Le rôle des protéines SMC/MukB

Chez *E. coli* et *B. subtilis*, la délétion des gènes *smc* et *mukB* entraîne de sévères défauts de croissance, sensibilise les cellules au choc thermique, conduit à une augmentation du nombre de cellules anucléées et une décondensation globale du nucléoïde a été observée (Britton, Lin & Grossman, 1998; Graumann, Losick & Strunnikov, 1998; Hiraga et al., 1989; Moriya et al., 1998; Niki et al., 1991). Chez *B. subtilis*, la délétion de *scpA* et/ou *scpB* conduit au même phénotype que celui du mutant Δsmc , démontrant que la présence des 3 protéines est nécessaire pour la fonctionnalité du complexe (Mascarenhas et al., 2002; Soppa et al., 2002).

Des défauts de l'expression de *topA*, codant l'ADN topoisomérase IA, entraînent une augmentation du surenroulement négatif de l'ADN (Sternglanz et al., 1981). Lorsque son expression est diminuée ou que son activité est limitée par une mutation dans le gène *topA*, les défauts de croissance, la thermosensibilité et les défauts de ségrégation des chromosomes, observés dans les simples mutants $\Delta mukB$ et Δsmc , sont supprimés (Lindow, Britton & Grossman, 2002; Sawitzke & Austin, 2000). A l'inverse, il a été démontré que les simples mutants $\Delta mukB$ et Δsmc sont hypersensibles aux inhibiteurs de l'ADN gyrase, qui réduisent le niveau de surenroulement négatif de l'ADN (Lindow et al., 2002). L'ensemble de ces résultats suggèrent que les protéines SMC et MukB jouent un rôle important dans le surenroulement négatif de l'ADN. Il a été proposé que les protéines SMC compactent l'ADN en stabilisant les supertours positifs de l'ADN, ce qui induit, par un mécanisme compensatoire, la formation de supertours négatifs ailleurs dans le génome (Lindow et al., 2002). En accord avec ces résultats, il a été démontré chez *B. subtilis*, que la protéine SMC affecte *in vitro* le surenroulement négatif de l'ADN plasmidique (Lindow et al., 2002).

Plusieurs études ont montré que les protéines SMC/MukB jouent un rôle clé dans la compaction et la ségrégation des chromosomes chez *B. subtilis* et *E. coli* (Graumann, 2000; Niki et al., 1991). La délétion du gène *smc* chez *B. subtilis* n'abolit pas la ségrégation des origines de réplication mais entraîne fréquemment des aberrations de leur localisation. De plus, la réplication et/ou la ségrégation de la région terminus et l'arrangement spatial du chromosome sont altérés dans un mutant Δsmc (Graumann, 2000), suggérant que la protéine SMC soit un organisateur spatial des chromosomes, nécessaire à chaque cycle cellulaire.

Chez *E. coli*, le mutant $\Delta mukB$ présente également des défauts de ségrégation de l'ADN (**Figure 52**), les bras droit et gauche du chromosome ne sont pas distribués distinctement dans

chaque moitié de cellule mais s'étendent d'un pôle à l'autre de la cellule avec la région *oriC* qui n'est pas localisée au centre de la cellule mais au « vieux pôle » (Danilova et al., 2007).

La protéine MukB colocalise avec la région *oriC*, suggérant que le complexe MukBEF agisse dans la région *oriC* afin d'initier le déplacement bidirectionnel de l'ADN après sa réplication (Danilova et al., 2007).

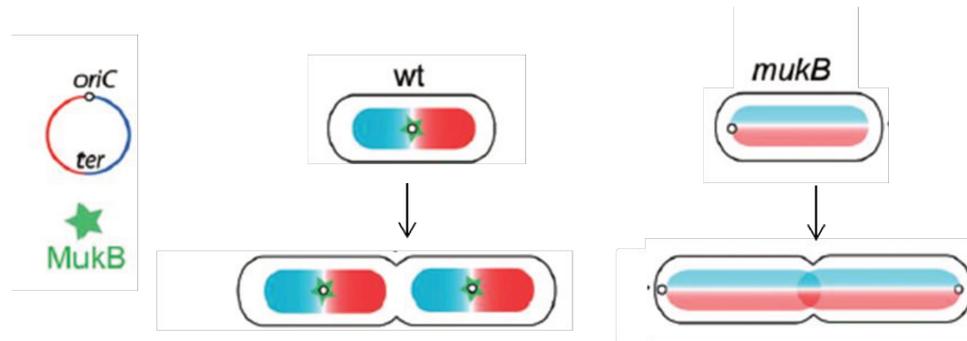


Figure 52: Modèle de l'organisation du chromosome de *E. coli* de la souche sauvage et du mutant $\Delta mukB$. La région *oriC*, le bras gauche et droit sont respectivement visualisés par un rond blanc, en rouge et en bleu. La localisation de la protéine MukB est indiquée par une étoile verte (adapté de (Danilova et al., 2007)).

Deux systèmes ayant un rôle clé dans la ségrégation des chromosomes ont été décrits chez les bactéries: le système ParAB-parS et les translocases à ADN FtsK/SpoIIIE (Kaimer, Schenk & Graumann, 2011; Mierzejewska & Jagura-Burdzy, 2012; Reyes-Lamothe, Nicolas & Sherratt, 2012). Des mutations dans l'un de ces deux systèmes ne conduit généralement pas à la mort cellulaire, en revanche le double mutant $\Delta mukB\Delta ftsK_C$ chez *E. coli* (Sivanathan et al., 2009; Yu, Weihe & Margolin, 1998) et les doubles mutants $\Delta smc\Delta spoIIIE$ et $\Delta smc\Delta sftA$ (*sftA* code un homologue de *ftsK*) chez *B. subtilis* (Britton & Grossman, 1999; Britton et al., 1998; Kaimer, Gonzalez-Pastor & Graumann, 2009; Lee & Grossman, 2006) ne sont pas viables.

Des expériences de microscopie à épifluorescence montrent que les protéines SMC et MukBEF s'assemblent au centre de la cellule (**Figure 53**) et agissent comme un centre de condensation de l'ADN. En effet, la surexpression de SMC conduit à l'hypercondensation du nucléoïde (Volkov et al., 2003). Il a donc été proposé qu'après l'initiation de la réplication ou la ségrégation des origines de réplication, SMC soit chargée sur l'ADN nouvellement synthétisé, au niveau des fourches de réplication, puis condense l'ADN nouvellement synthétisé (Volkov et al., 2003), en introduisant des supertours dans l'ADN ce qui facilite la ségrégation et la compaction de l'ADN. De plus, les protéines SMC jouent le rôle d'organisateur du chromosome en stabilisant les boucles d'ADN qui sont déplacées vers le pôle opposé (Mascarenhas et al., 2005).

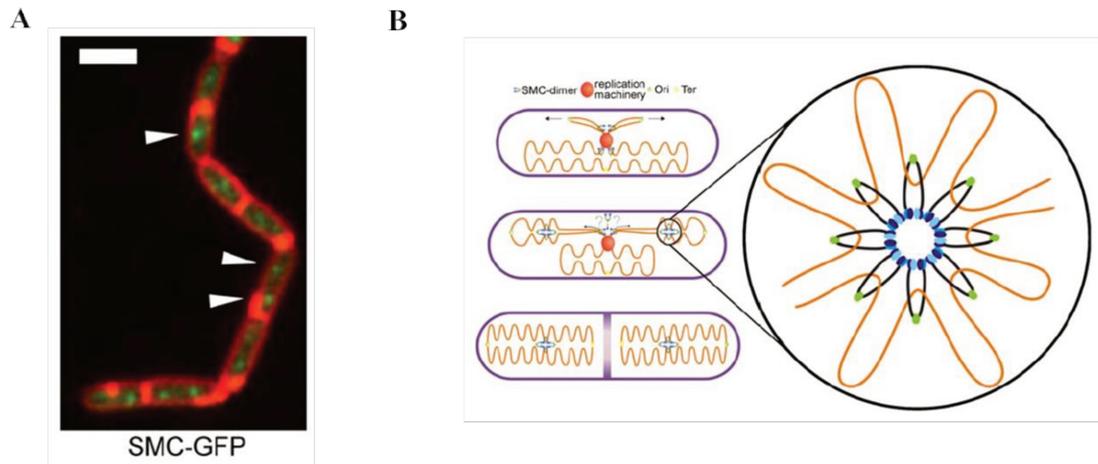


Figure 53: A) Analyse de la localisation de la protéine SMC-GFP chez *B. subtilis* par microscopie à épifluorescence. La protéine SMC et les membranes sont respectivement visualisées en vert et en rouge. La flèche blanche seule montre que SMC est localisée au centre de la cellule, les 2 flèches blanches montrent que dans une cellule en cours de division, SMC est observée sous forme de 2 foci, présents dans chaque moitié de la cellule. B) Modèle du fonctionnement du complexe SMC. Au début du cycle cellulaire, la réplication est initiée et les régions oriC sont séparées vers les pôles opposés. Il a été proposé que SMC soit chargée sur l'ADN au centre de la cellule au niveau de la machinerie de réplication (rond orange). Au cours du cycle cellulaire, le complexe SMC en forme de rosette forme 2 super-structures de SMC, une dans chaque demi-cellule, ce qui est essentiel pour la maintenance de l'arrangement spatial du chromosome. Ces super-structures permettent de connecter les boucles d'ADN comme indiqué sur l'agrandissement du schéma à droite (adapté de (Graumann & Knust, 2009)).

C- Les protéines de la sous-famille SbcC

Les protéines de la sous-famille SbcC possèdent les caractéristiques des protéines SMC et sont très similaires à la protéine eucaryote Rad50, avec 2 longs domaines coiled-coil, un domaine tête constitué d'un motif de liaison à l'ATP de type Walker A et un motif d'hydrolyse de l'ATP de type Walker B. En revanche, les protéines SbcC sont dépourvues de région charnière et dimérisent via un motif en doigt de zinc situé entre les deux monomères SbcC (**Figure 54**). Les protéines SbcC s'associent avec l'endonucléase Mre11-like, appelée SbcD et forment un complexe hétérotétramérique SbcC2/SbcD2. Les domaines « têtes » de SbcC se fixent aux nucléases SbcD (Graumann & Knust, 2009; Hopfner et al., 2002; Hopfner et al., 2001).

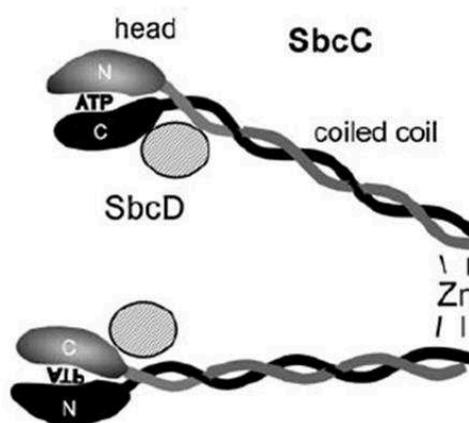


Figure 54: Structure des protéines SbcC chez *B. subtilis* et *E. coli*. SbcC forme un complexe avec l'endonucléase Mre11-like SbcD (d'après (Graumann & Knust, 2009)).

Chez *E. coli*, la délétion de *sbcC* supprime les défauts de recombinaison du mutant *recBC sbcB*, ce qui suggère que SbcC joue un rôle dans la recombinaison (Lloyd & Buckman, 1985).

Le complexe SbcCD possède une activité exonucléase 3'→5' ATP dépendante et une activité endonucléase ATP indépendante sur l'ADN simple brin (Connelly & Leach, 1996).

Certaines séquences dans l'ADN sont capables de former des structures secondaires (exemple des longs palindromes) qui empêchent la progression des fourches de réplication de l'ADN et augmentent la fréquence des mésappariements lors de la réplication de l'ADN et la recombinaison, ce qui conduit à des réarrangements chromosomiques. De telles structures ont été observées dans des mutants $\Delta recB$, $\Delta recC$, $\Delta sbcB$ ou $\Delta sbcC$ chez *E. coli* et il a été démontré *in vitro* que le complexe SbcCD reconnaît et clive des structures secondaires

(épingle à cheveux ou structure cruciforme) de l'ADN (Connelly, Kirkham & Leach, 1998; Connelly & Leach, 1996; Leach, Okely & Pinder, 1997). Il a été proposé que in vivo la fonction primaire de SbcCD soit de reconnaître et cliver ces structures secondaires qui surviennent lors de la réplication de l'ADN dans des régions chromosomiques contenant de longues séquences palindromiques (Chalker, Leach & Lloyd, 1988; Leach & Stahl, 1983).

L'introduction d'une séquence palindromique de 240 pb dans le chromosome de *E. coli* entraîne la mort cellulaire dans les cellules *sbcCD*⁺ dépourvues du gène *recA*, *recB* ou *recC*, suggérant que les cassures double brin de l'ADN introduites dans la séquence palindromique par le complexe SbcCD doivent être réparées par recombinaison homologue (Leach et al., 1997).

Des analyses biochimiques ont également montré que le complexe SbcCD de *E. coli* possède une activité ATP dépendante d'ouverture des structures en épingle à cheveux, en introduisant une coupure du côté 3' de la boucle simple brin de la structure secondaire puis grâce à son activité exonucléase 3'→5', le complexe SbcCD clive un brin d'ADN, ce qui génère des extensions 3' simple brin qui permettent de réparer l'ADN par recombinaison homologue et la reprise de la réplication de l'ADN (Connelly, de Leau & Leach, 1999; Connelly et al., 1998).

Chez *B. subtilis*, la délétion du gène *sbcC* n'affecte pas la croissance des bactéries en conditions standards et elle ne diminue que légèrement la survie cellulaire après exposition des cellules au rayonnement γ (Mascarenhas et al., 2006). En revanche, l'absence de SbcC diminue significativement la survie cellulaire après traitement des cellules à la mitomycine C (pour une dose de 50ng/mL de mitomycine C, le mutant Δ *sbcC* a une survie cellulaire de 13% contre 50 % pour la souche sauvage) (Mascarenhas et al., 2006). Par ailleurs chez *B. subtilis*, la délétion du gène *sbcC* dans un mutant Δ *recN* ou dans un mutant Δ *addAB* (la voie AddAB est l'analogue de la voie RecBCD chez *E. coli*) augmente significativement leur sensibilité aux agents endommageant l'ADN (rayonnement γ ou mitomycine C) (Mascarenhas et al., 2006). A l'inverse, la délétion du gène *sbcC* dans un mutant Δ *recA* n'augmente pas sa radiosensibilité et sa sensibilité à la mitomycine C, suggérant que SbcC agit dans un mécanisme RecA dépendant de réparation de l'ADN et exerce une fonction distincte de celle exercée par RecN ou AddAB (Mascarenhas et al., 2006). Des expériences de microscopie à épifluorescence montrent qu'après traitement des cellules à des agents provoquant des cassures double brin de l'ADN ou des pontages inter-brins, la protéine SbcC s'assemble transitoirement sous forme de foci au niveau de la machinerie de réplication (Mascarenhas et

a1., 2006), suggérant que SbcC agit sur l'ADN endommagé présent au niveau des fourches de réplication (blocage de la progression des fourches de réplication, chute de la machinerie de réplication sur l'ADN simple brin). SbcC pourrait être impliquée dans la reprise de la réplication en favorisant la recombinaison homologe et/ou la résolution des pontages inter-brins (Mascarenhas et al., 2006).

D- Les protéines de la sous-famille RecN

La protéine RecN possède les caractéristiques des protéines de la famille SMC avec deux domaines « tête » composés des domaines N et C terminaux, reliés par deux domaines « coiled-coil » qui sont plus courts que ceux des autres protéines de la famille SMC (240 acides aminés pour RecN contre 900 pour les protéines SMC) (**Figure 55**). Le domaine central de RecN contient 50 acides aminés qui ne possèdent pas de similarité avec la région charnière des autres protéines de la famille SMC. Contrairement aux autres protéines de la famille SMC, aucune interaction entre RecN et des protéines accessoires n'a été clairement établie.

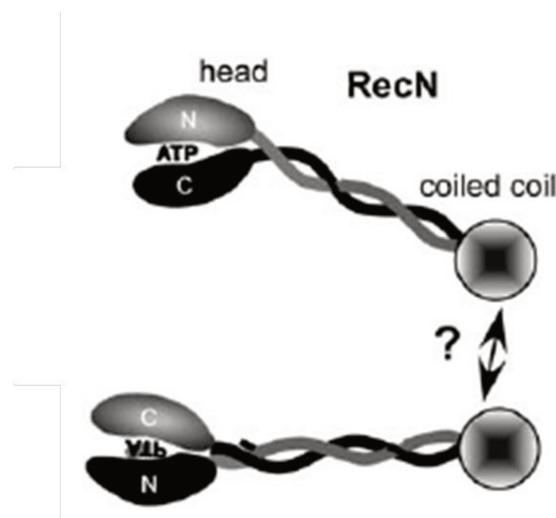


Figure 55: Structure des protéines RecN chez *B. subtilis* et *E. coli*. Le domaine coiled-coil est plus court que dans les autres protéines de la famille SMC (d'après (Graumann & Knust, 2009)).

Chez *E. coli*, des analyses transcriptomiques montrent que l'expression du gène *recN* est fortement induite, d'une manière dépendante de LexA, après exposition des cellules au rayonnement UV (induction d'un facteur 20 après exposition des cellules à une dose de 40 J/m²) (Courcelle et al., 2001). Par ailleurs des analyses protéomiques montrent que la protéine RecN est fortement induite après traitement des cellules à la mitomycine C (2 µg/mL) (Finch, Chambers & Emmerson, 1985). La délétion du gène *recN* n'entraîne pas de défauts cellulaires en conditions standards, en revanche elle sensibilise fortement les cellules à l'exposition au rayonnement γ ou à la mitomycine C (le mutant $\Delta recN$ est 1000 fois plus sensible à une concentration de 0,5µg/mL de mitomycine C que la souche sauvage) (Keyamura et al., 2013).

La protéine GFP-RecN forme des foci associés au nucléoïde en réponse à l'exposition aux agents endommageant l'ADN (mitomycine C ou rayonnement γ) et forme des agrégats dans le cytoplasme qui sont rapidement dégradés par la protéase ClpXP lorsque les cassures double brin de l'ADN sont réparées (Nagashima et al., 2006). Il a été montré qu'après exposition des cellules à la mitomycine C, la protéine RecA via son interaction physique avec RecN, recrute la protéine RecN au nucléoïde au niveau des cassures double brin de l'ADN (Keyamura et al., 2013; Vickridge et al., 2017). Le double mutant $\Delta recA \Delta recN$ présente la même sensibilité aux agents endommageant l'ADN, que le simple mutant $\Delta recA$ suggérant que la protéine RecN soit impliquée dans une voie de réparation de l'ADN dépendante de RecA. La délétion de *recN* dans une souche *recBC sbcBC* entraîne des défauts de la recombinaison lors de la conjugaison bactérienne (Lloyd, Picksley & Prescott, 1983) et il a été démontré que l'absence de *recN* augmente la sensibilité au rayonnement UV du double mutant *uvrB recF* (4 fois) (Wang & Smith, 1988) suggérant que la protéine RecN joue un rôle important dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue, en intervenant à la fois dans les voies RecFOR et RecBCD.

Récemment, il a été démontré chez *E. coli* qu'en présence de mitomycine C, la protéine RecN est requise pour maintenir les interactions entre chromatides sœurs et prévient la ségrégation des chromatides sœurs endommagées (Vickridge et al., 2017). Il a également été démontré que l'absence de RecN peut être compensée par une mutation qui affecte l'activité de décaténation de la topoisomérase IV. Ces résultats ont conduit les auteurs à proposer que la protéine RecN maintienne les chromatides sœurs, d'une manière similaire aux cohésines, ce qui empêche la diffusion des précaténanes situés en aval de la fourche de réplication, à travers les cassures double brin de l'ADN, ce qui permet d'augmenter les interactions entre les chromatides sœurs et facilite la réparation de l'ADN par recombinaison homologue (Vickridge et al., 2017). Il a par ailleurs été démontré que la présence de RecN accélère la réparation de l'ADN et permet à la cellule de redémarrer rapidement un nouveau cycle cellulaire (Vickridge et al., 2017).

Chez *B. subtilis*, le mutant $\Delta recN$ est sensible à la mitomycine C (à une concentration de 100 ng/mL, le mutant $\Delta recN$ est 9 fois plus sensible que la souche sauvage) et à l'exposition au rayonnement γ (la dose D50 de rayonnement γ est de 147 Gy pour la souche sauvage contre 92 Gy pour le mutant $\Delta recN$), suggérant que chez *B. subtilis*, RecN joue également un rôle important dans la réparation des cassures double brin de l'ADN (Kidane et al., 2004; Mascarenhas et al., 2006). Contrairement à ce qui a été montré chez *E. coli*, après traitement

des cellules à un agent endommageant l'ADN (mitomycine C, rayonnement γ), la protéine RecN-YFP est l'une des premières protéines à être recrutée au nucléoïde, au niveau des cassures double brin de l'ADN. Elle permet le recrutement au niveau des cassures double brin de l'ADN, des protéines RecF et RecO, qui favorisent ensuite le recrutement de la protéine RecA afin de former des centres de réparation de l'ADN (Kidane et al., 2004; Sanchez et al., 2006).

In vitro, l'ADN simple brin stimule l'activité APTase de RecN. RecN sous forme octamérique, fixe, en présence de Mg^{2+} , l'ADN simple brin ayant une extrémité 3'OH libre et le protège de la dégradation (Sanchez & Alonso, 2005). Il a également été démontré que la fixation de RecA sur l'ADN simple brin induit la dissociation de RecN (Sanchez & Alonso, 2005). L'ensemble de ces données suggère que in vivo RecN détecte les cassures double brin de l'ADN, permet le recrutement des protéines RecO, RecF et protège les extrémités 3'OH des extensions 3' simple brin. RecN induit indirectement le chargement de la protéine RecA sur l'ADN simple brin, ce qui conduit à sa dissociation de l'ADN et favorise ainsi l'étape de recherche d'homologie et d'envahissement de l'ADN double brin homologue, par les extensions 3' simple brin, chargées de la protéine RecA (Sanchez & Alonso, 2005).

E- Les protéines SMC chez D. radiodurans

Chez la bactérie *D. radiodurans*, 3 gènes codant des protéines appartenant à la famille SMC, la protéine SMC (dr1471), la protéine SbcC (dr1922) et la protéine RecN (dr1477), ont été identifiées dans son génome. Un homologue des gènes codant la protéine accessoire ScpB (dr1861) et SbcD (dr1921) ont également été identifiés chez *D. radiodurans* (White et al., 1999).

1°) La protéine SMC

Contrairement à ce qui a été démontré chez *B. subtilis* et *E. coli*, chez *D. radiodurans* l'absence de la protéine SMC n'entraîne pas de défaut de croissance en conditions standards, ni de défaut de ségrégation de l'ADN, de décondensation du nucléoïde et n'augmente pas le nombre de cellules anucléées, en comparaison avec la souche sauvage (Bouthier de la Tour et al., 2009). Le mutant Δsmc présente la même radiorésistance que la souche sauvage. En revanche, il est hypersensible aux inhibiteurs de l'ADN gyrase (pour une concentration de 20 ng/mL de novobiocine et 40 μ g/mL d'acide nalidixique, le mutant Δsmc est 100 fois plus sensible que la souche sauvage). Des expériences de microscopie à épifluorescence montrent que la protéine SMC-SPA forme des foci à la périphérie du nucléoïde (Bouthier de la Tour et al., 2009). Il a été proposé que la protéine SMC soit impliquée dans le contrôle du surenroulement de l'ADN, en favorisant le recrutement de l'ADN gyrase sur l'ADN et en régulant son activité (Bouthier de la Tour et al., 2009).

2°) La protéine SbcC

La délétion de l'opéron *sbcCD* n'entraîne pas de défaut de la croissance cellulaire en conditions standards mais augmente significativement la sensibilité de *D. radiodurans* à la mitomycine C et au rayonnement γ pour des doses supérieures à 10 kGy (à une dose de 20 kGy, le double mutant $\Delta sbcCD$ est 100 fois plus sensible au rayonnement γ que la souche sauvage). De plus, l'absence de *sbcCD* retarde la cinétique de reconstitution du génome et la reprise de la division cellulaire après exposition au rayonnement γ (retard de 90 min dans le mutant $\Delta sbcCD$) (Bentchikou et al., 2007). Ces effets sont augmentés lorsque l'absence de *sbcCD* est associée à l'absence de PolX, une ADN polymérase de la famille X, qui possède une activité exonucléase 3'→5', similaire à celle du complexe SbcCD chez *E. coli* (Blasius et al., 2006) (à une dose de 20 kGy le double mutant $\Delta sbcCD \Delta polX$ est 2000 fois plus sensible

que la souche sauvage). Ces données suggèrent que SbcCD et PolX exercent des fonctions complémentaires dans la réparation de l'ADN, en agissant sur des substrats différents et/ou dans voies différentes de réparation de l'ADN (Bentchikou et al., 2007).

Les effets cellulaires dus à l'absence des protéines SbcCD ne sont observés que pour des doses élevées de rayonnement γ , ce qui suggère que le complexe SbcCD est nécessaire pour réparer les cassures double brin de l'ADN lorsque celles-ci sont en nombre très important dans la cellule et que l'ensemble des mécanismes de réparation de l'ADN est mobilisé dans la cellule. SbcCD pourrait participer à la réparation des cassures résiduelles de l'ADN, qui serait actif uniquement lorsque les cellules subissent un nombre très important de lésions de l'ADN ou bien que les lésions sont difficiles à réparer par les systèmes classiques (par exemple, quand le mécanisme de réparation de l'ADN par ESDSA ne suffit pas et qu'un mécanisme de réparation par recombinaison homologue particulièrement efficace, est nécessaire) (Bentchikou et al., 2007).

Comme le mutant Δsmc , le mutant $\Delta sbcCD$ est hypersensible aux inhibiteurs de l'ADN gyrase, en effet les cellules sont 100 fois plus sensibles, que la souche sauvage, à une concentration de 40 $\mu\text{g/mL}$ d'acide nalidixique ou de 20 ng/mL de novobiocine et ce phénotype est exacerbé dans le double mutant $\Delta sbcCD \Delta smc$ (Bouthier de la Tour et al., 2009).

In vitro, le complexe SbcCD de *D. radiodurans* possède une activité exonucléase 3'→5' ATP indépendante, qui permet de cliver l'ADN simple et double brin, en présence d'ions Mn^{2+} ou Mg^{2+} (Hu et al., 2010). Le complexe SbcCD possède également une activité endonucléase ATP indépendante, capable de cliver l'ADN circulaire simple brin, d'induire une coupure simple brin dans de l'ADN circulaire double brin surenroulé, de cliver l'ADN à la jonction entre l'ADN simple brin et double brin et de cliver les structures en épingle à cheveux (Hu et al., 2010). Ces résultats suggèrent que le complexe SbcCD est requis pour la réparation des cassures double brin, situées au voisinage de structures en épingle à cheveux ou de pontages inter-brins. Le complexe SbcCD permettrait de générer des extrémités simple brin d'ADN qui peuvent ensuite être utilisées comme substrats dans les voies de réparation par ESDSA, recombinaison homologue ou par SSA (Bentchikou et al., 2007; Bouthier de la Tour et al., 2009).

3°) La protéine RecN

Chez *D. radiodurans*, la délétion du gène *recN* sensibilise les cellules aux rayonnements γ , UV et au traitement à la mitomycine C. L'introduction d'une mutation ponctuelle dans la séquence codante du gène *recN* entraîne la synthèse d'une protéine tronquée de 47 acides aminés dans sa région C-terminale et conduit au même phénotype que celui du mutant de délétion $\Delta recN$, ce qui démontre que le domaine C-terminal est essentiel à la fonction de RecN (Funayama et al., 1999).

La structure de la protéine RecN de *D. radiodurans* a été résolue et comme les autres protéines de la famille SMC, RecN contient un domaine « tête » reliées par deux courts et rigides domaines « coiled-coil » (Pellegrino et al., 2011; Pellegrino et al., 2012).

Des études *in vitro* ont montré que l'activité ATPase de RecN est stimulée par la présence d'ADN double brin et dépend de la concentration de la protéine RecN suggérant que des interactions RecN-RecN sont requises pour l'hydrolyse efficace de l'ATP et ces interactions sont stabilisées uniquement par la présence d'ADN double brin (Reyes et al., 2010; Pellegrino et al., 2012). Il a par ailleurs été démontré qu'en présence d'une ADN ligase, RecN stimule la ligation intermoléculaire de molécules d'ADN linéaires, en exerçant un rôle de cohésine qui permet de garder côte à côte les fragments d'ADN (Pellegrino et al., 2012; Reyes et al., 2010).

L'ensemble de ces données a conduit les auteurs à proposer que les cassures double brin de l'ADN soient reconnues par la protéine RecN sous une forme dimérique ouverte (**Figure 56**). La reconnaissance et la fixation de l'ADN sont réalisées via les domaines « tête » de RecN. L'interaction des domaines « tête » avec l'ADN favorise la polymérisation, ATP dépendante, de RecN le long de l'ADN, ce qui permet aux chromatides sœurs endommagées d'être maintenues entre elle à une distance spatiale d'environ 300 Å. La polymérisation de RecN à travers la cassure double brin permet de maintenir les extrémités d'ADN proches et favorise la réparation de l'ADN par recombinaison homologue. Le recrutement de la machinerie de réparation stimule l'hydrolyse de l'ATP, ce qui conduit à la dissociation de l'ADN de la protéine RecN et la mise en place du mécanisme de recombinaison homologue. La protéine RecN est ensuite recyclée pour détecter et se fixer à de nouveaux sites de cassure double brin de l'ADN (Pellegrino et al., 2012).

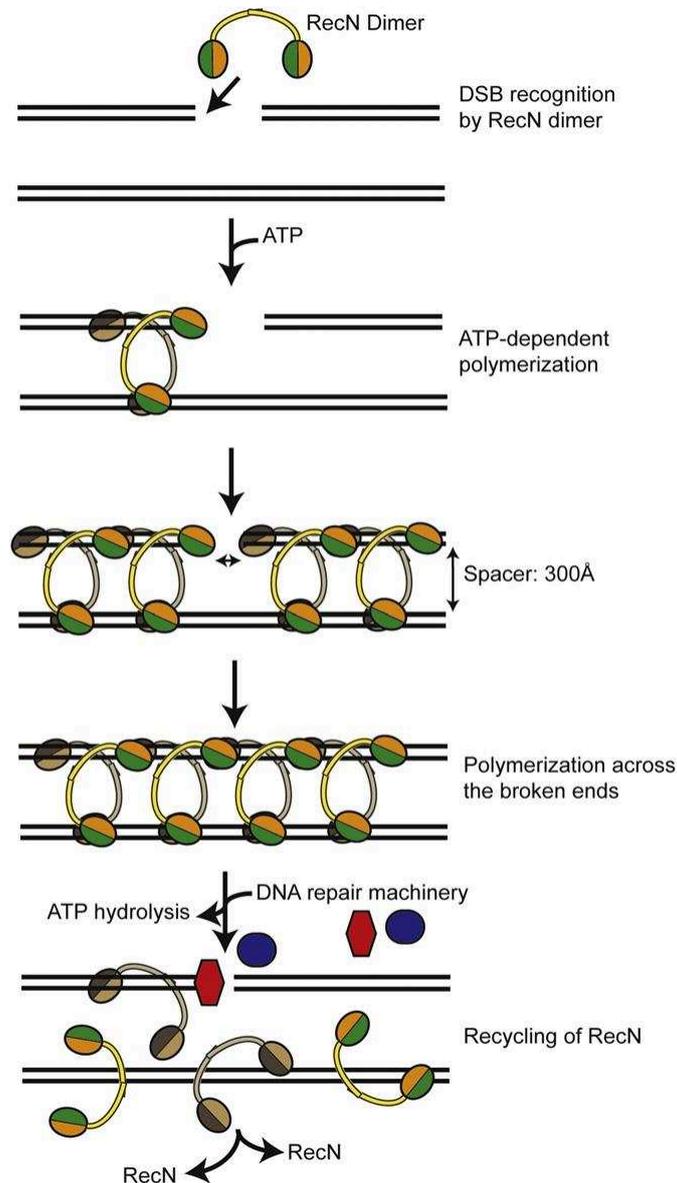


Figure 56: Modèle d'action de la protéine RecN dans la réparation des cassures double brin de l'ADN chez *D. radiodurans* (Pellegrino et al., 2012).

Très récemment, il a été démontré, que RecN interagit physiquement avec la recombinaise RecA et stimule *in vitro* la formation de la D-loop et l'échange de brin médié par RecA (Uranga et al., 2017). De plus *in vitro*, la fixation de la recombinaise RecA et la formation de la D-loop, stimulent l'activité ATPase de RecN (Uranga et al., 2017).

Il a donc été proposé (**Figure 57**) que RecA fixée sur l'ADN, recrute directement la protéine RecN via une interaction directe, ce qui permettrait à RecN d'exercer son rôle de cohésine entre les molécules d'ADN. RecA stimule ensuite l'activité ATPase de RecN. Une fonction possible de l'hydrolyse de l'ATP par RecN serait de générer un mouvement du complexe RecN ou RecN-RecA le long de l'ADN pour favoriser la recherche d'homologie lors de la recombinaison homologue (Uranga et al., 2017).

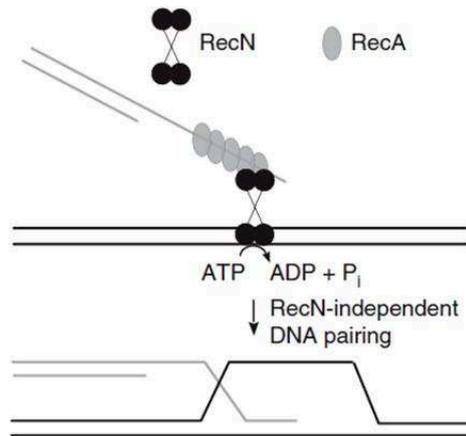


Figure 57: Modèle du rôle de RecN dans la stimulation de la recherche d'homologie lors de la recombinaison homologue chez *D. radiodurans* (d'après Uranga et al. 2017).

ARTICLE 2 (en préparation):

The absence of the RecN protein suppresses the cellular defects of *Deinococcus radiodurans* irradiated cells devoid of the PprA protein by limiting recombinational repair of DNA lesions.

**The absence of the RecN protein suppresses the cellular defects of
Deinococcus radiodurans irradiated cells devoid of the PprA protein by
limiting recombinational repair of DNA lesions**

Alice Devigne[¶], Laura Meyer[¶], Claire Bouthier de la Tour, Nicolas Eugénie, Suzanne Sommer
and Pascale Servant*.

Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université
Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

[¶] These authors contribute equally to this work

* corresponding author :

Email: pascale.servant@i2bc.paris-saclay.fr (PS)

Key words: *Deinococcus radiodurans*, PprA, RecN, homologous recombination

Short title: Suppression of Δ pprA defects by deletion of the recN gene

Abstract

The *Deinococcus radiodurans* bacterium is one of the most radioresistant organisms known. It can repair hundreds of radiation-induced DNA double-strand breaks without loss of viability and reconstitute an intact genome through RecA-dependent and RecA-independent DNA repair pathways. Among the *Deinococcus* specific proteins required for radioresistance, the PprA protein was shown to play a major role for accurate chromosome segregation and cell division after completion of DNA repair. Here, we analyzed the cellular role of the deinococcal RecN protein belonging to the SMC family and, surprisingly, observed that the absence of the RecN protein suppressed the sensitivity of cells devoid of the PprA protein to γ - and UV-irradiation and to treatment with MMC or DNA gyrase inhibitors. This suppression was not observed when Δ pprA cells were devoid of SMC or SbcC, two other proteins belonging to the SMC family. The absence of RecN also alleviated the DNA segregation defects displayed by Δ pprA cells recovering from γ -irradiation. When exposed to 5 kGy γ -irradiation, Δ pprA, Δ recN and Δ pprA Δ recN cells repaired their DNA with a delay of about one hour, as compared to the wild type cells. After irradiation, the absence of RecN reduced recombination between chromosomal and plasmid DNA, indicating that the deinococcal RecN protein is important for recombinational repair of DNA lesions. The transformation efficiency of genomic DNA is also reduced in the absence of the RecN protein. Here, we propose a model in which RecN, by favoring recombinational repair of DNA double strand breaks and by increasing cohesion of damaged DNA, might increase the topological DNA constraints in irradiated cells, with PprA protein being required to resolve them via its ability to recruit DNA gyrase and to stimulate its decatenation activity.

Author summary

The *Deinococcus radiodurans* bacterium is known for its exceptional resistance to ionizing radiation and other DNA damaging agents. Whereas most bacteria can only repair 2 to 3 DNA double strand breaks, *D. radiodurans* rapidly reconstitutes an intact genome from a myriad of DNA fragments. Among the *Deinococcus* specific proteins required for radioresistance, the PprA protein is required for accurate cell division and chromosome segregation upon recovery from DNA double strand breaks in irradiated bacteria. Surprisingly, we found that the absence of the RecN protein is able to suppress the various defects observed in irradiated cells devoid of the PprA protein. The deinococcal RecN protein was previously shown to possess a cohesin activity and to interact in vitro with the RecA recombinase. Here, we propose a model to explain the genetic interaction between PprA and RecN and the need, in *recN*⁺ bacteria, for the PprA protein which helps to the recruitment of the DNA gyrase to resolve the topological constraints generated by DNA double strand break repair through homologous recombination.

Introduction

The *Deinococcus radiodurans* bacterium possesses an exceptional resistance to the lethal effects of DNA damaging agents such as ionizing radiation, ultraviolet light, mitomycin C (MMC) or desiccation and is able to reconstruct a functional genome from hundreds of chromosomal fragments, conditions which are lethal for most other organisms. Many factors contribute to the radioresistance of *D. radiodurans*, such as efficient protection of proteins against oxidation, efficient DNA repair pathways, a condensed nucleoid structure favoring the non-diffusion of DNA fragments generated by irradiation and an up-regulation of deinococcal specific genes [for review see ([1-4]). The rapid reconstruction of an intact genome occurs mainly through an extended synthesis-dependent strand annealing (ESDSA) pathway and through homologous recombination (HR), two pathways mediated by RecFOR and RecA proteins [5-7]. A RecA-independent single strand annealing (SSA) process also participates in DNA double strand break (DSB) repair and requires the DdrB protein, a deinococcus single stranded DNA binding protein exhibiting a single strand annealing activity [8,9].

A mutation in the *pprA* gene (*DRA_0346*), a *Deinococcus* specific gene, generates extreme sensitivity to ionizing radiation and also to MMC and to gyrase inhibitors [10-12]. Recently, several studies showed that the PprA protein plays a crucial role in chromosome segregation and cell division after γ -irradiation or after treatment with DNA gyrase inhibitors [12,13]. In *D. radiodurans*, DNA gyrase is the only type II DNA topoisomerase and we showed that PprA interacts with DNA gyrase when cells recover from exposure to ionizing radiation and, in vitro, stimulates the DNA gyrase decatenation activity [14]. The involvement of PprA in chromosome segregation after irradiation led us to explore its potential genetic interaction with proteins belonging to the SMC family.

The proteins of the SMC family are conserved in the three domains of life and are involved in various aspects of chromosome dynamics such as chromosome condensation, sister chromatid cohesion, segregation of chromosomes between daughter cells and DNA repair. The *E. coli* MukBEF and *B. subtilis* SMC-ScpA-ScpB complexes were shown to play an important role in chromosome segregation, the absence of a protein of these complexes increasing the number of anucleated cells [15,16]. In *E. coli*, a direct physical interaction between the MukB protein and topoisomerase IV has been demonstrated in vitro and in vivo [17]. This interaction allows coordination between chromosome decatenation and chromosome segregation. In *B. subtilis*, SMC complexes are required to segregate newly replicated DNA [18,19]. In contrast, the absence of the SMC protein in *D. radiodurans* does not affect bacterial growth [20]. The *smc* null mutant cells have the same nucleoid shape as wild type cells, do not present defects in chromosome segregation and are as resistant as the wild type to γ -irradiation [20]. However, *D. radiodurans* cells devoid of the SMC protein are more sensitive than the wild type to gyrase inhibitors such as nalidixic acid and novobiocin [20]. The same phenotype of sensitivity to gyrase inhibitors has been observed in the absence of the SbcC protein, another protein belonging to the SMC family, and the sensitivity to gyrase inhibitors was exacerbated in the $\Delta smc \Delta sbcCD$ double mutants [20]. The SbcCD complex, a prokaryotic homolog of the Rad50/Mre11 eukaryotic complex, was also shown to be involved in DNA double strand break repair in *D. radiodurans* [21].

In addition to SMC and SbcC, *D. radiodurans* encodes RecN (DR1477), a third SMC-like protein. The structure of the *D. radiodurans* RecN protein has been resolved and, as the other proteins of the SMC family, RecN contains two major domains, a nucleotide binding domain and a short and rigid coiled-coil domain [22]. *E. coli* and *B. subtilis* *recN* mutants are highly sensitive to ionizing radiation and MMC [23,24]. In *E. coli*, RecN forms nucleoid-associated foci in response to DNA damage and its recruitment to nucleoid is dependent on

the RecA protein [25]. In contrast, in *B. subtilis*, RecN is recruited to the nucleoid very early after DNA damage and allows the subsequent recruitment of the RecF and RecO mediators facilitating the recruitment of the RecA protein to form the DNA repair centers [24,26]. In vitro, the *D. radiodurans* RecN protein interacts with the RecA protein, binds to DNA after RecA and has a presynaptic role in RecA-mediated homologous recombination [27]. Moreover, the deinococcal RecN protein efficiently stimulates intermolecular ligation of linear DNA and exhibits a cohesin activity [22,28].

Here, we analyze the phenotype of the double mutants lacking the PprA protein and a protein of the SMC family. While no major differences have been observed between the phenotypes of the single Δ pprA mutant and the double mutants Δ pprA Δ smc or Δ pprA Δ sbcC, we showed that when a Δ recN deletion was introduced in Δ pprA mutant cells, the phenotypes associated with the pprA deletion, such as sensitivity to γ - and UV-radiations, MMC or DNA gyrase inhibitors, and defects in chromosome segregation, were suppressed. Moreover, the absence of RecN reduced recombination between chromosomal and plasmid DNA when cells were exposed to γ -rays. We propose a model to explain how the absence of RecN might suppress the numerous defects observed in cells devoid of the PprA protein by limiting recombinational repair of DNA double strand breaks.

Results

The absence of RecN suppresses the radiosensitivity of Δ pprA mutant

Recent studies suggest that the PprA protein plays a central role in cell recovery after DNA damage by assisting DNA gyrase in segregation of chromosomal DNA after DNA repair. Proteins of the SMC family are involved in various chromosomal dynamics, including partition of sister chromosomes at cell division. We asked whether the deinococcal SMC or the two SMC-like proteins SbcC and RecN functionally interact with PprA for its role in radioresistance.

Bacteria harboring the various pairwise combinations of Δ pprA and the SMC-family knockout alleles were exposed to γ -rays in order to determine their survival rate. The survival to γ -irradiation of Δ pprA Δ smc and Δ pprA Δ sbcC bacteria was similar to that of the Δ pprA single mutant (Fig 1A). In contrast, the Δ pprA Δ recN mutant bacteria were much more resistant to γ -irradiation, as compared to the parental Δ pprA bacteria, and exhibited a survival similar to those of the single Δ recN mutant bacteria (Fig 1B). For instance, the survival rate of cells exposed to 10 kGy γ -radiation rise from 3×10^{-3} in the Δ pprA mutant to 2×10^{-1} in the Δ pprA Δ recN double mutant, a survival similar to those of the single Δ recN mutant bacteria (2.4×10^{-1}) (Fig 1B). These results suggest that the absence of the RecN protein suppresses the radiosensitivity of cells devoid of the PprA protein.

Then, we tested if the absence of the RecN protein also suppressed the sensitivity of the Δ pprA mutant from exposure to other genotoxic agents. First, we showed that Δ recN bacteria were highly sensitive to MMC in a plate assay where the cells are continuously challenged with the drug. Indeed, the survival of a Δ recN mutant decreased by a factor > 1000 when cells were exposed to 20 ng/mL of MMC (Fig 2A). We verified that the mutant phenotype was due to the absence of the RecN protein by showing that, when RecN was expressed from an ectopic locus under the control of its natural promoter, the Δ recN/recN⁺

bacteria recovered a wild type level of MMC resistance (Fig 2A). The absence of the RecN protein suppressed the sensitivity of the Δ pprA mutant to MMC when cells were exposed to 10 ng/mL MMC, but only increased the survival of Δ pprA bacteria by a factor of about 10 when cells were exposed to 20 ng/ml MMC (Fig 2A).

The Δ recN bacteria were moderately sensitive to UV light (survival reduced by a factor of about 10 when cells were exposed to 600 J/m² UVC-radiation) and the absence of RecN also partially suppressed the UV-sensitivity of cells devoid of the PprA protein, the Δ pprA Δ recN mutant bacteria exhibiting a UV-sensitivity similar to those of Δ recN single mutant bacteria (Fig 2B).

Thus, we assume that RecN directs the cells on a way that requires the PprA protein for their survival when their DNA is damaged.

The absence of RecN suppresses sensitivity of Δ pprA mutant bacteria to DNA gyrase inhibitors.

Cells devoid of the PprA protein are extremely sensitive to gyrase inhibitors such as nalidixic acid and novobiocin [11,14]. This enhanced sensitivity was proposed to be correlated with the physical interaction of PprA with the DNA gyrase and its action in regulating DNA gyrase activities [11,14]. The Δ sbcC and Δ smc mutants also exhibit sensitivity to DNA gyrase inhibitors, with the phenotype exacerbated in the Δ sbcC Δ smc double mutant [20].

Thus, we examined whether the deinococcal proteins belonging to the SMC family could modulate the level of sensitivity of Δ pprA cells to DNA gyrase inhibitors. For this purpose, we tested the sensitivity to nalidixic acid or novobiocin of pairwise combinations of Δ pprA with Δ smc, Δ sbcC, and Δ recN alleles. As shown in Fig 3, Δ pprA, Δ sbcC, and Δ smc single mutant cells were significantly more sensitive to both drugs than the wild type, consistent with previous reports [11,14,20]. In contrast, the Δ recN mutant cells had a wild

type level of sensitivity to DNA gyrase inhibitors when exposed to 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nalidixic acid or 5 ng/mL novobiocin and they were 10-fold more resistant than wild type cells when exposed to 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nalidixic acid or to 20 ng/mL novobiocin (Fig 3). We verified that this increased resistance of the ΔrecN mutant cells to gyrase inhibitors was due to the absence of the RecN protein. Indeed, when the RecN protein was expressed from an ectopic locus in $\Delta\text{recN}/\text{recN}^+$ mutants, the cells exhibited a lower survival than the single ΔrecN bacteria, similar to those of the wild type (S1 Fig). In the double mutant combinations, while the lack of SMC or SbcC proteins increased the sensitivity of the ΔpprA mutant to 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nalidixic acid or 5 ng/mL novobiocin, the absence of RecN had the opposite effect, since it suppressed the hypersensitive phenotype of the ΔpprA mutant bacteria. Indeed, the double ΔrecN ΔpprA mutant showed a near wild type survival on plates supplemented with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nalidixic acid or 5 ng/mL novobiocin (compare lines 3 and 4 in Fig 3). However, when exposed to 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nalidixic acid or to 20 ng/mL novobiocin, the ΔpprA ΔrecN mutant bacteria were about 100-fold more sensitive than wild type cells exposed to the same doses of gyrase inhibitors.

Absence of RecN alleviates the DNA segregation defects displayed by the ΔpprA cells recovering from irradiation.

A study of the morphology of cells recovering from γ -irradiation showed that cells devoid of the PprA protein present cell division abnormalities, leading us to propose that PprA plays a crucial role in the control of DNA segregation/cell division after DNA damage [12]. Since we found that the absence of RecN suppressed the ΔpprA sensitivity to γ -radiation (see Fig 1B), we asked whether the absence of RecN also alleviated the DNA segregation defect of ΔpprA mutant cells exposed to γ -radiation. For this purpose, we examined, by epifluorescence and deconvolution microscopy, the cell morphology of wild type, ΔpprA , ΔrecN and ΔpprA

Δ recN mutants at different times during post-irradiation incubation. As shown in Fig 4, in the absence of stress, the three mutant strains showed normal diplococcus/tetracoccus distribution and wild type cell morphology, with the nucleoid occupying a defined cellular space in the majority of the cells. After exposure to γ -irradiation (3.8 kGy), the Δ pprA mutant developed cell division abnormalities including enlarged cells, anucleate cells, and cells with guillotined or mis-segregated DNA, confirming previous reports [12] (Fig 4). At times 4 and 7 hours post-irradiation incubation, abnormal cells globally represented more than 60% of the population.

The Δ recN mutant exposed to 3.8 kGy of γ -irradiation showed larger cells than the wild type. Indeed 50.4% (123/244) of the mutant cells were large cells, versus 2% (4/197) of the wild type cells, when observed after 4 h post-irradiation incubation. We also observed a reduction in the global nucleoid compaction in 20% (49/244) and 35.4% (11/313) of the Δ recN mutant cells, as compared to 1.5% (3/197) and 2.4% (6/250) of wild type cells after 4 h and 7 h of post-irradiation incubation, respectively. These results are consistent with the cohesin-like activities displayed in vitro by the deinococcal RecN protein [28]. Abnormalities in the distribution of DNA between daughter cells in 11.5 % (36/313) of the Δ recN population versus 1.2% (3/250) of the wild type cells were also observed after 7 h of post-irradiation incubation. Anucleated Δ recN and wild type cells were also present after 7 h of post-irradiation incubation, representing 5.1 % (16/313) versus 1.6% (4/250) of the population, respectively. However, all the defects of the Δ recN cells observed during post-irradiation incubation were not comparable with those found in a Δ pprA mutant with 51.5% of cells (70/316) presenting segregation defects and 25% being anucleated 7 h after exposure to 3.8 kGy γ -irradiation. Moreover, these morphological changes are likely to be transient, since the majority of the Δ recN cells remained viable when exposed to a 3.8 kGy γ -irradiation (see Fig

1B) whereas, the majority of the cells devoid of the PprA protein died under the same conditions.

The morphology of the irradiated $\Delta\text{recN } \Delta\text{pprA}$ double mutant cells perfectly matched that of the single ΔrecN mutant (Fig 4). Although, 7 h after exposure to 3.8 kGy γ -irradiation, both strains presented cells with decondensed nucleoids, abnormal DNA segregation (11.5% and 12.4% for ΔrecN and $\Delta\text{recN } \Delta\text{pprA}$, respectively) and anucleate cells (5.1% for ΔrecN and 3.9% for $\Delta\text{recN } \Delta\text{pprA}$ mutant cells), these defects are not quantitatively comparable with those found in the single ΔpprA mutant. We conclude that the absence of RecN suppressed the aberrant chromosome segregation phenotype observed after irradiation of the single ΔpprA mutant.

RecN expression is induced after exposure to γ -rays

Gene expression following γ -irradiation has been investigated in *D. radiodurans* using transcriptomic approaches which identified a set of genes upregulated during recovery [29,30]. In these studies, *recN* gene was not identified as upregulated after γ -irradiation. To revisit these results, we chose to analyze RecN expression after exposure to 3.8 kGy γ -irradiation. For this purpose, the RecN protein was tagged at its C-terminal end with a FLAG epitope and expressed in replacement of the native RecN protein. Bacteria expressing the RecN-FLAG protein were as resistant to MMC as the wild type bacteria, demonstrating the functionality of the fusion protein (S2 Fig). In order to follow the expression of both PprA and RecN proteins, we constructed a strain carrying the *pprA::HA* and the *recN::FLAG* alleles. Without irradiation, the *pprA::HA* protein was not detected but was quickly observed and reached its maximal induction 2 h after irradiation (Fig. 5), results consistent with those previously obtained [12]. The *recN::FLAG* protein was present before irradiation and its concentration began to increase at 1 h and did not decrease before 5 h of post-irradiation

incubation (Fig 5). In accord with these results, we observed, by fluorescence microscopy, that the tagged RecN::Cherry protein was not only present throughout the nucleoid after, but also prior to exposure of the cells to γ -rays (S3 Fig).

Efficient DNA double strand break repair in cells devoid of RecN and PprA proteins

To investigate the possible role(s) of the RecN protein in DNA DSB repair, we measured the kinetics of reconstitution of an intact genome in Δ pprA, Δ recN and Δ pprA Δ recN bacteria exposed to 5 kGy γ -irradiation, a dose that introduced approximately 200 DNA DSB per genome equivalent in *D. radiodurans* cells [31]. Recovery from DNA damage was monitored by the appearance of the complete pattern of the 11 resolvable genomic DNA fragments generated by NotI digestion. As seen in Fig 6, Δ recN, Δ pprA, and Δ pprA Δ recN cells repaired their DNA with a delay of about one hour as compared to the wild type strain, reconstituting an intact genome within 4 h post-irradiation. These results show that RecN and PprA do not have additive effects on DNA DSB repair and suggest that they are involved in a same DNA DSB repair pathway.

RecN acts in a RecA-dependent DNA repair pathway.

In vitro, *D. radiodurans* RecA and RecN proteins interact, and it has also been shown that RecN stimulates RecA-dependent DNA strand invasion [27]. We thus measured the survival of Δ recN Δ recA double mutant bacteria when exposed to γ -irradiation and found that the Δ recN Δ recA mutant had the same survival as the single Δ recA mutant (Fig 7A). We previously showed that the DdrB protein acts in a RecA-independent SSA pathway. Here, we showed that Δ recN Δ ddrB double mutant bacteria were more sensitive to γ -irradiation than the single Δ ddrB and Δ recN mutant bacteria (Fig 7B). All these results suggest that RecN acts in a RecA-dependent and DdrB-independent DNA DSB repair pathway, such as ESDSA or HR.

RecN is involved in recombinational repair of DNA lesions generated by γ -irradiation

To test the effect of a *recN* deletion on HR, we used a plasmid-by-chromosome recombination assay in which a 5'tetA and a 3'tetA are located at the chromosomal amyE locus and on a resident plasmid, respectively. The chromosomal 5'tetA and the plasmid 3'tetA contain a 438 bp homologous region [32] (S4 Fig). In this assay, the reconstitution of a functional tetA gene resulted from the integration of the plasmid in the chromosomal DNA. It was previously shown that the frequency of [Tet^R] bacteria dropped at least 40 fold in cells devoid of the RecA or the RecF protein, indicating that the reconstitution of a functional tetA gene was generated through a classical RecA-promoted strand exchange mechanism [32]. Whereas the frequency of [Tet^R] bacteria was the same (2.8×10^{-5}) in wild type and Δ recN bacteria before irradiation, it increased in the wild type cells by a factor of 11.1 after 5 kGy γ -irradiation and only by a factor 5.9 in cells devoid of the RecN protein, suggesting that RecN plays an important role in plasmid-by-chromosome γ -induced recombination (Fig 8).

We also tested the effect of the absence of the RecN protein on recombination between host DNA and genomic DNA introduced by transformation, and found that the efficiency of transformation by genomic DNA decreased 2-fold in Δ recN bacteria as compared with wild type bacteria, whereas the absence of the RecN protein did not have any inhibitory effect on the frequencies of transformation by plasmid DNA (Fig 9).

Discussion

The nucleoid of radioresistant *Deinococcus* species adopts a high degree of compaction [33]. Such a condensed nucleoid may participate to radiation resistance by preventing the dispersion of radiation-induced DNA fragments and may provide suitable scaffolds for DNA repair. In bacteria, the structure and the compaction of the nucleoid is regulated by a complex network including abundant nucleoid associated proteins (NAPs), DNA-topoisomerases, proteins of the SMC family, and effectors that modify the properties of these proteins. In *D. radiodurans* bacteria, HU and DNA gyrase have been identified as the most abundant proteins involved in the organization of the deinococcal nucleoids [34]. DNA topoisomerases, via their activities in DNA supercoiling, DNA relaxation and DNA decatenation are required for DNA replication, DNA transcription, and DNA repair [35]. SMC family proteins were shown to be involved in DNA condensation, DNA segregation and DNA repair [for review see [36]]. The absence of MukB in *E. coli* or of SMC in *B. subtilis* results in severe defects including increase in the production of anucleate cells, temperature sensitivity under rapid growth conditions, altered nucleoid organization, decondensation of the nucleoid, and hypersensitivity to gyrase inhibitors [15,16,37-41]. In contrast, *D. radiodurans* cells devoid of the SMC protein have a phenotype similar to those of wild-type cells, and no increase in the number of anucleate cells was observed [20]. Three proteins belong to the deinococcal SMC family, the SMC protein (DR_1471), the SbcC protein (DR_1922) and the RecN protein (DR_1477). In *E. coli*, after cell exposure to UV irradiation, an extensive reorganization, and an increased RecN-dependent compaction, of the nucleoid were observed [42]. Here, we showed that, after γ -irradiation, the global compaction of the nucleoids diminished in *D. radiodurans* cells devoid of the RecN protein, with 35% of the Δ recN cells containing a decondensed nucleoid after 7 h post-irradiation incubation. These results suggest that RecN protein may play a role to maintain the compact structure of the nucleoid after irradiation.

This hypothesis is consistent with the cohesin-like activity displayed, *in vitro*, by the deinococcal RecN protein [28]. Moreover, it was proposed that in *D. radiodurans*, the cohesive activity of RecN could be essential to maintain in close proximity the hundreds of fragments generated by exposure to high doses of γ -irradiation [22].

Interestingly, Δ recN mutant bacteria were less sensitive than wild type bacteria to nalidixic acid and novobiocin, two DNA gyrase inhibitors, whereas Δ smc or Δ sbcC bacteria were more sensitive than wild type (Fig 3). In *D. radiodurans*, the only type II DNA topoisomerase is DNA gyrase, cells being naturally devoid of DNA topoisomerase IV. We have previously shown that, *in vitro*, the deinococcal DNA gyrase possess both DNA negative supercoiling and decatenation activities, that are inhibited by novobiocin and nalidixic acid [14]. The lower sensitivity of Δ recN mutant bacteria to DNA gyrase inhibitors, as compared to wild type cells, might be explained if the RecN protein is involved in maintaining sister chromatid interactions (SCIs), a RecN activity that has been recently demonstrated [43]. In contrast, the deinococcal DNA gyrase, via its decatenation activity, probably decreases sister chromatid interactions by removing precatenanes formed behind replication forks [44], and by allowing chromosome segregation after completion of DNA replication. Thus, the absence of RecN, by lowering sister chromatid interactions, might partially compensate a decreased gyrase activity generated by treatment with DNA gyrase inhibitors. In favor of this hypothesis, it was recently observed that in *E. coli*, the MMC sensitivity of Δ recN mutant cells was alleviated by alterations in DNA topoisomerase IV [43].

We have previously shown that cells devoid of the PprA protein exhibited major defects in chromosome segregation and/or cell division after completion of DNA repair. These defects were proposed to be responsible of the radiosensitivity of the Δ pprA bacteria [12]. We show here that, in a Δ pprA context, the absence of the RecN protein suppressed not only the sensitivity to DNA gyrase inhibitors, but also abnormalities in chromosome

segregation after irradiation and the sensitivity of Δ pprA mutant cells to DNA damaging agents. Previous studies suggested that PprA and RecN do not interact directly [14,45]. Here, we showed that the absence of the RecN protein did not increase the radiosensitivity of cells devoid of RecA, suggesting that RecN, as PprA [12,29], might be involved in a RecA-dependent DNA DSB repair pathway. Two RecA-dependent DNA DSB repair pathways were described for reconstitution of the *D. radiodurans* genome after γ -irradiation: (1) an extended synthesis-dependent strand annealing process (ESDSA) and (2) a homologous recombination process (HR). The two processes are initiated by RecA-dependent strand invasion. In ESDSA, strand invasion primes DNA synthesis on overlapping fragments, initiated by Pol III and elongated by Pol I and Pol III [6], liberating newly synthesized single stranded DNA that anneal to complementary single stranded extensions, forming long double stranded DNA intermediates. In homologous recombination, strand invasion promotes RecA-dependent strand exchange. In *E. coli*, RecN plays a crucial role in homologous recombination-dependent DSB repair and is required upstream of RecA-mediated strand exchange [25]. Recently, Uranga et al. showed that, *in vitro*, the *D. radiodurans* RecN and RecA proteins interact and RecA protein binds to DNA before the binding of RecN protein [27]. Thus, these authors proposed that the RecN protein has a presynaptic role in RecA-mediated homologous DNA pairing [27].

The modest sensitivity of the *D. radiodurans* Δ recN mutant cells to ionizing radiation and their high sensitivity to MMC suggest that the deinococcal RecN protein might be required for DNA double strand break repair through homologous recombination, but not through ESDSA, ESDSA being the main DNA DSB repair pathway in irradiated cells devoid of the RecN protein. Here, we showed that the deinococcal RecN protein is involved in recombinational repair of DNA DSB. Indeed, homologous recombination between 5'tetA chromosomal DNA and 3'tetA plasmid DNA is induced by exposure to γ -rays, but the level of

the induction is reduced in the absence of the RecN protein. Moreover, when cells were not exposed to γ -irradiation, the absence of the RecN protein had no effect on the recombination frequency between 5'tetA chromosomal DNA and 3'tetA plasmid DNA. The absence of the RecN protein also decreases the frequency of transformation by genomic DNA, whereas it does not have any effect on the frequency of transformation by plasmid DNA. All these results suggest that RecN is required when numerous recombination events take place in the cell, when many DNA DSB have to be repaired after exposure to high doses of γ -irradiation, or when genomic DNA was introduced by transformation in cells.

Here, we propose a model to explain the genetic interaction between PprA and RecN. The RecN protein, by stimulating the cohesion of sister chromatids, might favor DNA DSB repair through homologous recombination and the formation of complex networks that have to be resolved before to achieve segregation of chromosomal DNA in the daughter cells. Pellegrino et al. [22] proposed that RecN, in dimeric form, would recognize DNA DSB and keep the extremities in close proximity. The RecN-dependent maintenance of the DNA extremities close to each other might increase the topological constraints generated during homologous recombination. Although the RecA protein promotes homologous pairing of DNA, topological constraints limit extension of DNA strand exchange. Thus, an important role of PprA might be :(1) to recruit DNA gyrase to resolve topological constraints generated during DNA strand exchange when cells repair numerous DNA DSB by homologous recombination and, (2) to increase DNA gyrase decatenation activity to allow the segregation of the chromosomes between the daughter cells after completion of DNA repair, when PprA is located at the division septum. In the absence of the RecN protein and of its cohesin activity, the majority of DNA DSBs are probably processed through ESDSA, a mechanism which does not create the same topological constraints, as those generated during DNA strand exchange, and the segregation of chromosomes might take place after completion of DNA

repair without the need of PprA to stimulate the DNA gyrase decatenase activity, as is the case in non-irradiated cells.

Materials and Methods

Bacterial strains, plasmids, oligonucleotides, media

Bacterial strains and plasmids are listed in Table 1. All *D. radiodurans* strains were derivatives of strain R1 (ATCC 13939). *D. radiodurans* was grown in TGY2X (1% tryptone, 0.2% dextrose, 0.6% yeast extract) at 30°C with aeration or on TGY1X plates solidified with 1.5% agar. When necessary, media were supplemented with the appropriate antibiotics used at the following final concentrations: chloramphenicol, 3.5 µg/mL; spectinomycin, 75 µg/mL, kanamycin, 6 µg/mL, hygromycin 50 µg/mL, and rifampicin 25 µg/mL. Transformation of *D. radiodurans* with PCR products, genomic DNA or plasmids was performed as described previously [12]. $\Delta\text{smc}\Omega\text{cat}$ and $\Delta\text{sbcC}\Omega\text{kan}$ alleles have been previously described [20,21]. The $\Delta\text{recN}\Omega\text{kan}$, the $\Delta\text{recN}\Omega\text{cat}$ deletion mutants and the $\text{recN}::\text{FLAG}\Omega\text{cat}$, $\text{recN}::\text{cherry}\Omega\text{cat}$ strains expressing tagged RecN proteins were constructed in this study by the tripartite ligation method [46].

The genetic structure and purity of the mutants were checked by PCR (S5 and S6 Figs). The sequence of oligonucleotides used for strain construction and diagnostic PCR will be provided on request. Chromosomal DNA of *D. radiodurans* was extracted as previously described [47]. PCR amplification of DNA fragments, using plasmid or genomic DNA as template, was performed using Phusion DNA polymerase (Thermo Scientific).

γ -irradiation

To measure cell survival after exposure to ionizing radiation, exponential phase cultures, grown in TGY2X, were concentrated to an $A_{650\text{nm}} = 20$ in TGY2X and irradiated on ice with a ^{60}Co -irradiation system (Centre d’Energie Atomique, Saclay, France) at a dose rate of 6000 Gy/h or with a ^{137}Cs irradiation system (Institut Curie, Orsay, France) at a dose rate of 1080

Gy/h. Following irradiation, diluted samples were plated on TGY plates. Colonies were counted after 3–4 days incubation at 30°C.

For fluorescence microscopy or western blot analysis, exponential phase cultures, grown in TGY2X, were concentrated to an $A_{650\text{nm}} = 20$ in TGY2X and irradiated on ice with a ^{137}Cs irradiation system (Institut Curie, Orsay, France) at a dose rate of 1080 Gy/h.

Cell survival to DNA gyrase inhibitors, UV-radiation, and MMC.

Cultures of cells were serially diluted and aliquots (10 μL) of each dilution spotted on TGY agar supplemented, or not, with increasing concentrations of novobiocin, nalidixic acid or MMC, or exposed to different doses of UV-radiation. Plates were incubated at 30°C for 3, 4 or 5 days.

Fluorescence microscopy

DNA and membranes of cells were stained as previously described with DAPI (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and FM4-64 (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [48] and spotted on a thin layer of TGY2X-agarose 1% for microscopy observation. The stained cells were observed using a Leica DMIREZ microscope. Images were captured with a CCD cool SNAP HQ2 camera (Roper Instruments). The final reconstructed images were obtained by deconvoluting Z-series with the Metamorph software (Universal Imaging Corp.)

Localization of Cherry-tagged RecN protein

Non-irradiated or irradiated cultures (3.8 kGy) of GY16126 bacteria expressing the RecN::Cherry protein were diluted in 10 mL TGY2X to an $A_{650\text{nm}} = 0.2$ and incubated at 30°C with shaking. Aliquots of 500 μL were taken at different times during post-irradiation incubation and DAPI (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added before incubation at room temperature for 5 min.

The cells were then collected by centrifugation and the resultant cell pellets were resuspended with 20 μ L of 10 mM MgSO₄. Cell suspension (2 μ L) of were observed by fluorescence microscopy. Images were analyzed with Metamorph and ImageJ software.

Western blot analysis

The expression of RecN and PprA proteins was analyzed after γ -irradiation. 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 culture were centrifuged. The pellets were suspended in 150 μ L of SSC 1X buffer and the cells were disrupted as described previously [20]. After centrifugation, the protein concentration was measured (Bio-Rad protein assay dye reagent), and 5 μ g of proteins were subjected to electrophoresis through a 12% Glycine SDS-PAGE acrylamide gel. 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) and/or monoclonal rabbit anti-FLAG antibodies (Sigma-Aldrich) in TBS containing 3% powdered milk plus 0.05% Tween 20. After extensive washes in TBS with 0.05% Tween 20, the membrane was incubated with anti-mouse IgG and/or anti-rabbit IgG (Promega), 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).

Kinetics of DNA repair measured by pulsed-field gel electrophoresis

Non-irradiated (NI) or irradiated (5 kGy) cultures were diluted in TGY2X to an $A_{650} = 0.2$ and incubated at 30°C. At different post-irradiation incubation times, culture aliquots (5 mL) were removed to prepare DNA plugs as described previously [49]. The agarose embedded DNA

plugs were digested for 16 h at 37°C with 10 units of NotI restriction enzyme. After digestion, the plugs were subjected to pulsed field gel electrophoresis as previously described [50].

Recombination between chromosomal and plasmid DNA

Cells containing plasmid p15002 were plated on TGY agar + spectinomycin (75 µg/mL) and incubated at 30 °C during 3 days. Six colonies of the wild type strain and 7 colonies of the Δ recN strain were inoculated in 3 mL of TGY2X + spectinomycin (75 µg/mL) and incubated at 30°C, 150 rpm rotation. To measure recombination between 5' *tetA* chromosomal DNA and 3' *tetA* plasmid DNA after γ -irradiation, bacterial cultures were grown to an $A_{650nm} = 0.6$ before being concentrated by centrifugation in TGY2X to an $A_{650nm} = 20$ and irradiated on ice at a dose of 5 kGy with a ^{137}Cs irradiation system (Institut Curie, Orsay) at a dose rate of 1080 Gy/h. Following irradiation, samples of 30 µL were inoculated in 3 mL of TGY2X and incubated at 30°C, 150 rpm. After 20 hours of post-irradiation incubation, appropriate dilutions of bacterial culture were plated on TGY and TGY + tetracycline 2.5 µg/mL. Colonies were counted after 3 days of incubation at 30 °C. Unirradiated controls were treated as irradiated cells, except that they were maintained on ice without irradiation during the period when the irradiated cells were exposed to γ -rays.

Transformation of *D. radiodurans* by genomic or plasmid DNA

To prepare competent cells, exponentially growing bacteria were harvested by centrifugation, resuspended at 5×10^8 cells/mL in TGY2X medium supplemented with 30 mM CaCl_2 and 10% (V/V) glycerol, and stored at -80°C . For transformation, aliquots (100 µL) of competent cells were thawed on ice and mixed with an equal volume of TGY- CaCl_2 before DNA (genomic DNA or plasmid DNA) was added. After 20 min at 0°C and 60 min at 30°C , 800 µL of TGY2X were added and the cells were incubated for a further 5 h to allow expression of rifampicin (transformation by genomic DNA) or spectinomycin (transformation by plasmid

DNA) resistance. Diluted samples were plated on TGY plates containing the appropriate antibiotics.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Adriana Bailone for valuable discussions and for her critical reading of the manuscript and Michael DuBow for polishing our English. A. Devigne and L. Meyer gratefully acknowledge the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI) for their doctoral training grants. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the University Paris-Sud, and the Agence Nationale de la Recherche (ANR "Radioresistance"-11-BSV3-01701 to SS). This work was carried out in compliance with the current laws governing genetic experimentation in France. We thank the Institute Curie for the use of the ^{137}Cs irradiation system.

REFERENCES

1. Slade D, Radman M (2011) Oxidative Stress Resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 133-191.
2. Ishino Y, Narumi I (2015) DNA repair in hyperthermophilic and hyperradioresistant microorganisms. *Curr Opin Microbiol* 25: 103-112.
3. Daly MJ (2009) A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. *Nat Rev Microbiol* 7: 237-245.
4. Confalonieri F, Sommer S (2011) Bacterial and archaeal resistance to ionizing radiation. *J Phys* doi:10.1088/1742-6596/261/1/012005.
5. Zahradka K, Slade D, Bailone A, Sommer S, Averbeck D, et al. (2006) Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. *Nature* 443: 569-573. Epub 2006 Sep 2027.
6. Slade D, Lindner AB, Paul G, Radman M (2009) Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans*. *Cell* 136: 1044-1055.
7. Bentschikou E, Servant P, Coste G, 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. Xu G, Lu H, Wang L, Chen H, Xu Z, et al. (2010) DdrB stimulates single-stranded DNA annealing and facilitates RecA-independent DNA repair in *Deinococcus radiodurans*. *DNA Repair (Amst)* 9: 805-812.
9. Bouthier de la Tour C, Boissard S, Norais C, Toueille M, Bentschikou E, 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.
10. Narumi I, Satoh K, Cui S, Funayama T, Kitayama S, et al. (2004) PprA: a novel protein from *Deinococcus radiodurans* that stimulates DNA ligation. *Mol Microbiol* 54: 278-285.
11. Kota S, Charaka VK, Ringgaard S, Waldor MK, Misra HS (2014) PprA contributes to *Deinococcus radiodurans* resistance to nalidixic acid, genome maintenance after DNA damage and interacts with deinococcal topoisomerases. *PLoS One* 9: e85288.

12. Devigne A, Mersaoui S, Bouthier-de-la-Tour C, Sommer S, Servant P (2013) The PprA protein is required for accurate cell division of gamma-irradiated *Deinococcus radiodurans* bacteria. *DNA Repair (Amst)* 12: 265-272.
13. Kota S, Charaka VK, Misra HS (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.
14. Devigne A, Bouthier de la Tour C, Guérin P, Lisboa J, Quevillon-Cheruel S, et al. (2016) PprA protein is involved in chromosome segregation via its physical and functional interaction with DNA gyrase in irradiated *Deinococcus radiodurans* bacteria. *MSphere* 1: e00036-00015.
15. Yamanaka K, Ogura T, Niki H, Hiraga S (1996) Identification of two new genes, mukE and mukF, involved in chromosome partitioning in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 250: 241-251.
16. Britton RA, Lin DC, Grossman AD (1998) Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning. *Genes Dev* 12: 1254-1259.
17. Hayama R, Marians KJ (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.
18. Gruber S, Veening JW, Bach J, Blettinger M, Bramkamp M, et al. (2014) Interlinked sister chromosomes arise in the absence of condensin during fast replication in *B. subtilis*. *Curr Biol* 24: 293-298.
19. Wang X, Tang OW, Riley EP, Rudner DZ (2014) The SMC condensin complex is required for origin segregation in *Bacillus subtilis*. *Curr Biol* 24: 287-292.
20. Bouthier de la Tour C, Toueille M, Jolivet E, Nguyen HH, Servant P, et al. (2009) The *Deinococcus radiodurans* SMC protein is dispensable for cell viability yet plays a role in DNA folding. *Extremophiles* 13: 827-837.
21. Bentschikou E, Servant P, Coste G, Sommer S (2007) Additive effects of SbcCD and PolX deficiencies in the in vivo repair of DNA double strand breaks in *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 189: 4784-4790.
22. Pellegrino S, Radzimanowski J, de Sanctis D, Boeri Erba E, McSweeney S, et al. (2012) Structural and functional characterization of an SMC-like protein RecN: new insights into double-strand break repair. *Structure* 20: 2076-2089.
23. Picksley SM, Attfield PV, Lloyd RG (1984) Repair of DNA double-strand breaks in *Escherichia coli* K12 requires a functional recN product. *Mol Gen Genet* 195: 267-274.
24. Kidane D, Sanchez H, Alonso JC, Graumann PL (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. *Mol Microbiol* 52: 1627-1639.
25. Keyamura K, Sakaguchi C, Kubota Y, Niki H, Hishida T (2013) RecA protein recruits structural maintenance of chromosomes (SMC)-like RecN protein to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 288: 29229-29237.
26. Sanchez H, Kidane D, Castillo Cozar M, Graumann PL, Alonso JC (2006) Recruitment of *Bacillus subtilis* RecN to DNA double-strand breaks in the absence of DNA end processing. *J Bacteriol* 188: 353-360.
27. Uranga LA, Reyes ED, Patidar PL, Redman LN, Lusetti SL (2017) The cohesin-like RecN protein stimulates RecA-mediated recombinational repair of DNA double-strand breaks. *Nat Commun* 8: 15282.
28. Reyes ED, Patidar PL, Uranga LA, Bortoletto AS, Lusetti SL (2010) RecN is a cohesin-like protein that stimulates intermolecular DNA interactions in vitro. *J Biol Chem* 285: 16521-16529.
29. Tanaka M, Earl AM, Howell HA, Park MJ, Eisen JA, et al. (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.
30. Liu Y, Zhou J, Omelchenko MV, Beliaev AS, Venkateswaran A, et al. (2003) Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4191-4196.
31. Cox MM, Battista JR (2005) *Deinococcus radiodurans* - the consummate survivor. *Nat Rev Microbiol* 3: 882-892.

32. Ithurbide S, Bentchikou E, Coste G, Bost B, Servant P, et al. (2015) Single strand annealing plays a major role in RecA-independent recombination between repeated sequences in the radioresistant *Deinococcus radiodurans* bacterium. *PLoS Genet* 11: e1005636.
33. Levin-Zaidman S, Englander J, Shimoni E, Sharma AK, Minton KW, et al. (2003) Ringlike structure of the *Deinococcus radiodurans* genome: a key to radioresistance? *Science* 299: 254-256.
34. Toueille M, Mirabella B, Guerin P, Bouthier de la Tour C, Boisnard S, et al. (2012) A comparative proteomic approach to better define *Deinococcus* nucleoid specificities. *J Proteomics* 75: 2588-2600.
35. Champoux JJ (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 70: 369-413.
36. Nolivos S, Sherratt D (2014) The bacterial chromosome: architecture and action of bacterial SMC and SMC-like complexes. *FEMS Microbiol Rev* 38: 380-392.
37. Niki H, Jaffe A, Imamura R, Ogura T, Hiraga S (1991) The new gene *mukB* codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. *EMBO J* 10: 183-193.
38. Sawitzke JA, Austin S (2000) Suppression of chromosome segregation defects of *Escherichia coli* *muk* mutants by mutations in topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1671-1676.
39. Danilova O, Reyes-Lamothe R, Pinskaya M, Sherratt D, Possoz C (2007) *MukB* colocalizes with the *oriC* region and is required for organization of the two *Escherichia coli* chromosome arms into separate cell halves. *Mol Microbiol* 65: 1485-1492.
40. Moriya S, Tsujikawa E, Hassan AK, Asai K, Kodama T, et al. (1998) A *Bacillus subtilis* gene-encoding protein homologous to eukaryotic SMC motor protein is necessary for chromosome partition. *Mol Microbiol* 29: 179-187.
41. Lindow JC, Kuwano M, Moriya S, Grossman AD (2002) Subcellular localization of the *Bacillus subtilis* structural maintenance of chromosomes (SMC) protein. *Mol Microbiol* 46: 997-1009.
42. Odsbu I, Skarstad K (2014) DNA compaction in the early part of the SOS response is dependent on *RecN* and *RecA*. *Microbiology* 160: 872-882.
43. Vickridge E, Planchenault C, Cockram C, Junceda IG, Espeli O (2017) Management of *E. coli* sister chromatid cohesion in response to genotoxic stress. *Nat Commun* 8: 14618.
44. Cebrian J, Castan A, Martinez V, Kadomatsu-Hermosa MJ, Parra C, et al. (2015) Direct Evidence for the Formation of Precatenanes during DNA Replication. *J Biol Chem* 290: 13725-13735.
45. Kota S, Misra HS (2008) Identification of a DNA processing complex from *Deinococcus radiodurans*. *Biochem Cell Biol* 86: 448-458.
46. Menecier S, Coste G, Servant P, Bailone A, Sommer S (2004) Mismatch repair ensures fidelity of replication and recombination in the radioresistant organism *Deinococcus radiodurans*. *Mol Genet Genomics* 272: 460-469.
47. Norais C, Servant P, Bouthier-de-la-Tour C, Coureux PD, Ithurbide S, 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.
48. Nguyen HH, de la Tour CB, Toueille M, Vannier F, Sommer S, et al. (2009) The essential histone-like protein HU plays a major role in *Deinococcus radiodurans* nucleoid compaction. *Mol Microbiol* 73: 240-252.
49. Harris DR, Tanaka M, Saveliev SV, Jolivet E, Earl AM, et al. (2004) Preserving genome integrity: the *DdrA* protein of *Deinococcus radiodurans* R1. *PLoS Biol* 2: e304.
50. Lecointe F, Shevelev IV, Bailone A, Sommer S, 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.

Strains	Description	source or reference
D. radiodurans		
R1 / GY9613	ATCC 13939	Laboratory stock
GY 11733	rif Δ 9	[46]
GY 11983	Δ recN Ω kan	This work
GY 12251	Δ pprA Ω cat	[12]
GY 12428	Δ smc Ω cat	[20]
GY 12909	Δ sbcC Ω kan	[21]
GY13669	Δ recN Ω kan Δ ISDRA2 Ω tet Ω PrecN:: Δ recN Ω cat	This work
GY 14615	pprA::HA Ω kan	[12]
GY 14641	Δ pprA Ω cat Δ recN Ω kan	This work
GY 14655	Δ pprA Ω cat Δ sbcC Ω kan	This work
GY14664	Δ pprA Ω kan	This work
GY14665	Δ recN Ω cat	This work
GY 14671	pprA::HA-kan recN:: Δ FLAG-cat	This work
GY 14687	Δ pprA Ω kan Δ smc Ω cat	This work
GY 15102 ^(a)	<i>amyE</i> '::(<i>PgroE</i> ::5'tetA' Ω kat::hph)::'amyE	[32]
GY 15147	GY15102 (p15002)	[32]
GY 15913	recN:: Δ FLAG-cat	This work
GY 16126	recN:: Δ cherry-cat	This work
GY 17111	GY15102 Δ recN Ω cat (p15002)	This work
Plasmids		
p11559	Shuttle vector E. coli/D radiodurans, Spc ^R	Laboratory stock
p15002 ^(a)	Shuttle vector E. coli/D radiodurans, Spc ^R , 3'tetA	[32]

Table 1: Bacterial strains and plasmids

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

FIGURE LEGENDS

Fig 1. Survival to γ -irradiation of *D. radiodurans* and mutant bacteria. Bacteria were exposed to γ -irradiation at doses indicated on the abscissa and cell survival was measured as described in the Materials and Methods. **A.** Wild type (closed squares), Δ prpA (open circles), Δ sbpC (closed circles), Δ sbpC Δ prpA (open squares), Δ smc (open triangles) Δ smc Δ prpA (closed triangles). **B.** Wild type (closed squares), Δ prpA (open circles), Δ recN (closed circles), Δ prpA Δ recN (open squares). The results are the average of at least three independent experiments.

Fig 2. Δ recN Δ prpA double mutant cells exhibited the same sensitivity to MMC or UV treatments as the single Δ recN mutant cells. Serial dilutions of bacterial cultures of wild type, Δ recN, Δ recN/recN⁺, Δ prpA, Δ recN Δ prpA were spotted on plates **A.** containing 0, 10 or 20 ng/mL of MMC or **B.** before to be exposed to 0, 600 or 700 J/m² of UV-radiation.

Fig 3. Survival to gyrase inhibitors of *D. radiodurans* and mutant bacteria. Serial dilutions of cultures of wild type, Δ recN, Δ prpA, Δ recN Δ prpA, Δ smc, Δ smc Δ prpA, Δ sbpC and Δ sbpC Δ prpA strains were spotted on plates with, or without, nalidixic acid or novobiocin. Plates were incubated at 30°C for 5 days.

Fig 4. Cell morphology of wild type, Δ recN, Δ prpA, Δ prpA Δ recN mutant bacteria during post-irradiation incubation. The cells were not exposed, or exposed to 3.8 kGy γ -radiation and observed by fluorescence microscopy before irradiation (NI) or after 4 h and 7 h post-irradiation incubation.

Fig 5. Expression of RecN and PprA proteins is induced after γ -irradiation. D. radiodurans pprA::HA-kan recN::FLAG-cat cell extracts from non-irradiated (NI) or cells exposed to 3.8 kGy γ -irradiation and incubated during the indicated periods were subjected to SDS-PAGE and analyzed by western blotting with anti-HA and anti-FLAG antibodies.

Fig 6. Kinetics of DNA DSB repair in wild type, Δ recN, Δ pprA, and Δ pprA Δ recN bacteria followed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). PFGE shows NotI treated DNA from unirradiated cells (NI) and from irradiated cells (5 kGy) immediately after irradiation (time 0) and at the indicated post-irradiation incubation times (h).

Fig 7. Survival to γ -irradiation of wild type, Δ recA, Δ recN, Δ recN Δ recA, Δ addrB and Δ recN Δ addrB bacteria. Bacteria were exposed to γ -irradiation at doses indicated on the abscissa and survival was measured as described in the Materials and Methods. **A.** Wild type (closed squares), Δ recN (open circles), Δ recA (open squares), Δ recA Δ recN (closed triangles). **B.** Wild type (closed squares), Δ recN (open circles), Δ addrB (closed circles), Δ addrB Δ recN (closed triangles). The results are the average of at least three independent experiments.

Fig 8. Induction of the recombination between 5'tetA chromosomal DNA and 3'tetA plasmid DNA after γ -irradiation decreased in the absence of the RecN protein. Mean values of [Tet^R] frequencies in wild type and Δ recN bacteria, all containing the p15002 plasmid, are calculated from at least 6 independent experiments.

Fig 9. Frequencies of plasmid and chromosomal transformation in wild type and Δ recN bacteria. Wild type (closed square) and Δ recN (open circle) bacteria were transformed with

different concentrations of **A.** p11559 plasmid DNA conferring spectinomycin (Spc) resistance or **B.** genomic DNA purified from GY11733 (source of genomic DNA conferring rifampicin resistance). Appropriate dilutions of the transformation mixture were plated on TGY plates to measure the number of viable cells and on TGY plates supplemented with spectinomycin or rifampicin to select transformants. Transformation frequencies were expressed as the number of transformants divided by the number of viable cells in the transformation mixtures. The results are the average of at least three independent experiments.

Supporting information

S1 Fig. Absence of RecN protein decreases sensitivity to gyrase inhibitors. Serial dilutions of cultures of wt, Δ recN, Δ recN/recN+ were spotted on plates in the absence (no drug), or presence, of novobiocin (20 ng/mL) or nalidixic acid (40 μ g/mL) and plates were incubated at 30 °C for 5 days.

S2 Fig. The tagged RecN::FLAG protein is functional. Serial dilutions of bacterial cultures of wild type, Δ recN and recN::flag-cat were spotted on a plate containing 20 ng/mL of MMC.

S3 Fig. Cellular localization of the RecN::Cherry tagged protein after γ -irradiation of *D.radiodurans* cells. Bacteria expressing a RecN::Cherry fusion protein recovering from γ irradiation (3.8 kGy) were visualized by fluorescence microscopy at the indicated times of post-irradiation incubation. Blue spots show DNA stained with DAPI. Red spots show the RecN::Cherry proteins. Overlays of DAPI/Cherry images are also shown.

S4 Fig. Schematic representation of the recombination assay between chromosomal and plasmid DNA (from [32]).

S5 Fig. Schematic representation and test of the genetic structure and the purity of the deletion-substitution mutants. A. Schematic representation of the allele replacement events in the pprA (A.1), sbcC (A.2) and smc (A.3) genes. Short arrows indicate the position of primers used for diagnostic PCR and expected sizes of wild type and mutant PCR fragments

are indicated **B.** PCR-analysis of Δ pprA (B.1), Δ sbcC (B.2) and Δ smc (B.3) candidates. The marker sizes are indicated on the left of the PCR-analysis gels.

S6 Fig. Schematic representation and test of the homozygosity of the Δ recN and Δ recN Δ pprA mutants. **A.** Schematic representation of the allele replacement events in the pprA (A.1) and recN (A.2) genes. Short arrows indicate the position of primers used for diagnostic PCR. **B.** PCR-analysis of Δ pprA (B.1) and Δ recN (B.2) candidate mutants.

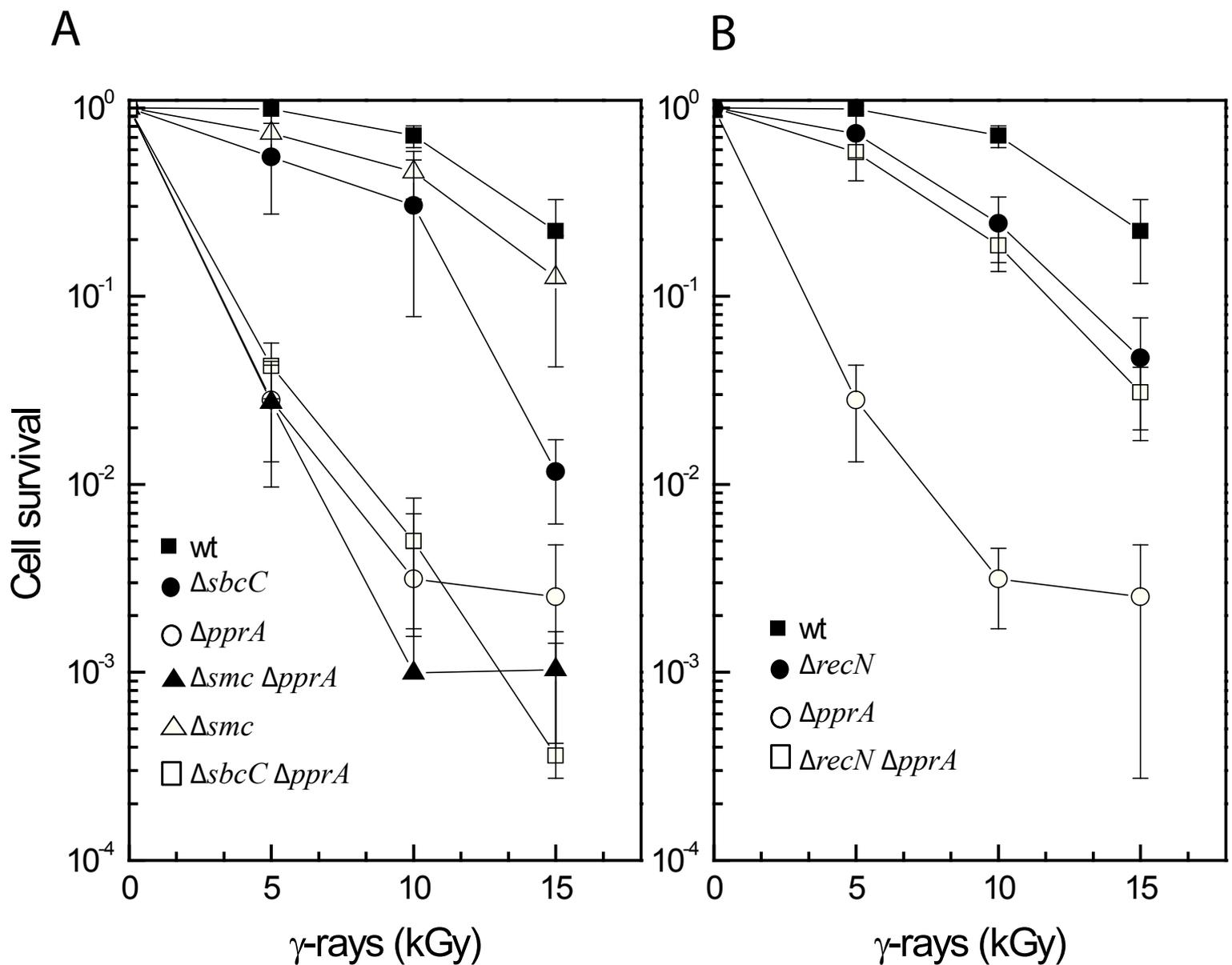


Fig 1. Survival to γ -irradiation of *D. radiodurans* and mutant bacteria. Bacteria were exposed to γ -irradiation at doses indicated on the abscissa and cell survival was measured as described in the Materials and Methods. **A.** Wild type (closed squares), $\Delta pprA$ (open circles), $\Delta sbcC$ (closed circles), $\Delta sbcC \Delta pprA$ (open squares), Δsmc (open triangles) $\Delta smc \Delta pprA$ (closed triangles). **B.** Wild type (closed squares), $\Delta pprA$ (open circles), $\Delta recN$ (closed circles), $\Delta pprA \Delta recN$ (open squares). The results are the average of at least three independent experiments.

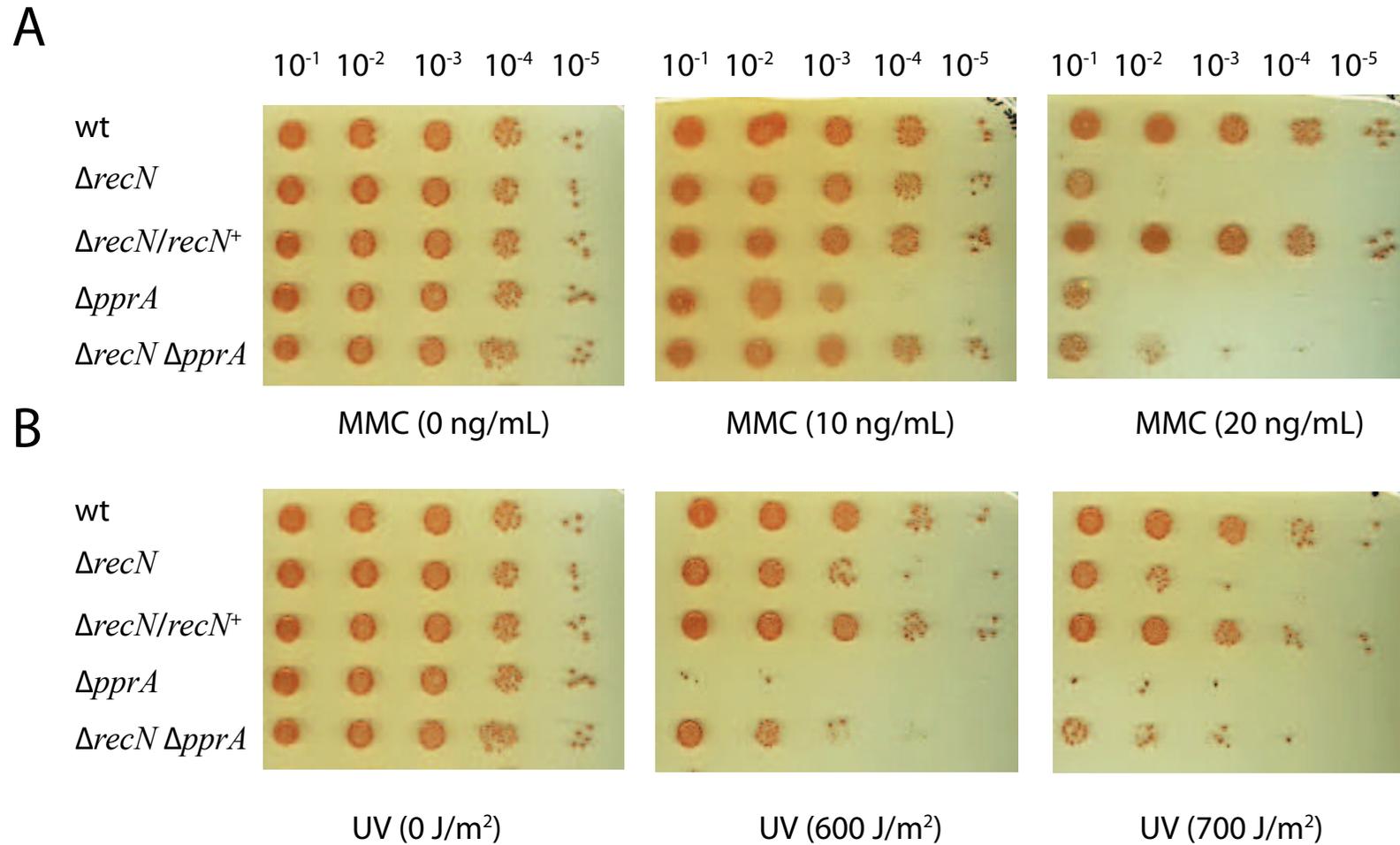


Fig 2. $\Delta recN \Delta pprA$ double mutant cells exhibited the same sensitivity to MMC or UV treatments as the single $\Delta recN$ mutant cells. Serial dilutions of bacterial cultures of wild type, $\Delta recN$, $\Delta recN/recN^+$, $\Delta pprA$, $\Delta recN \Delta pprA$ were spotted on plates **A.** containing 0, 10 or 20 ng/mL of MMC or **B.** before to be exposed to 0, 600 or 700 J/m² of UV-radiation.

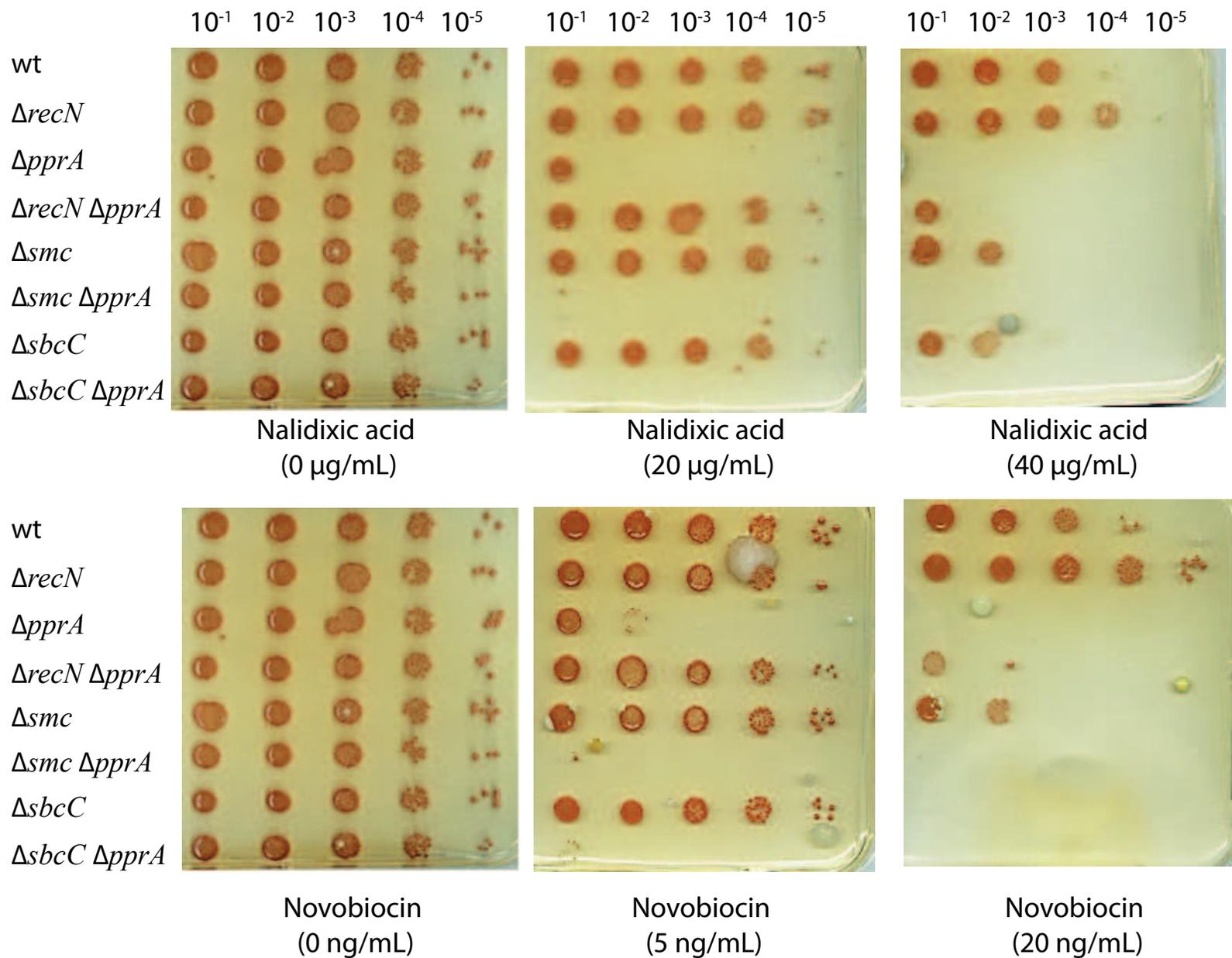


Fig 3. Survival to gyrase inhibitors of *D. radiodurans* and mutant bacteria. Serial dilutions of cultures of wild type, *ΔrecN*, *ΔpprA*, *ΔrecN ΔpprA*, *Δsmc*, *Δsmc ΔpprA*, *ΔsbcC* and *ΔsbcC ΔpprA* strains were spotted on plates with, or without, nalidixic acid or novobiocin. Plates were incubated at 30°C for 5 days.

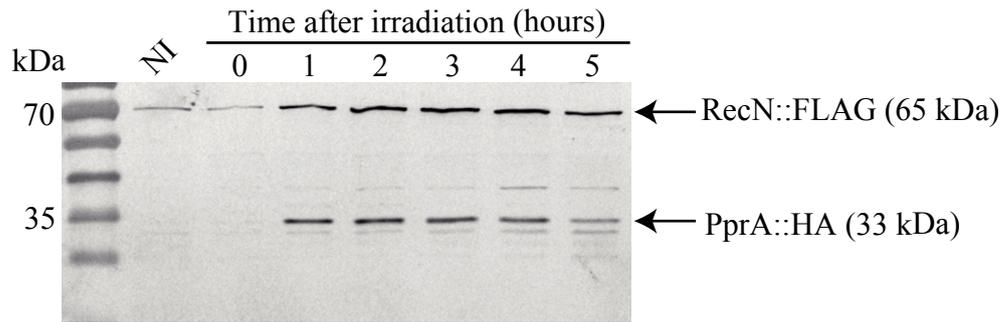
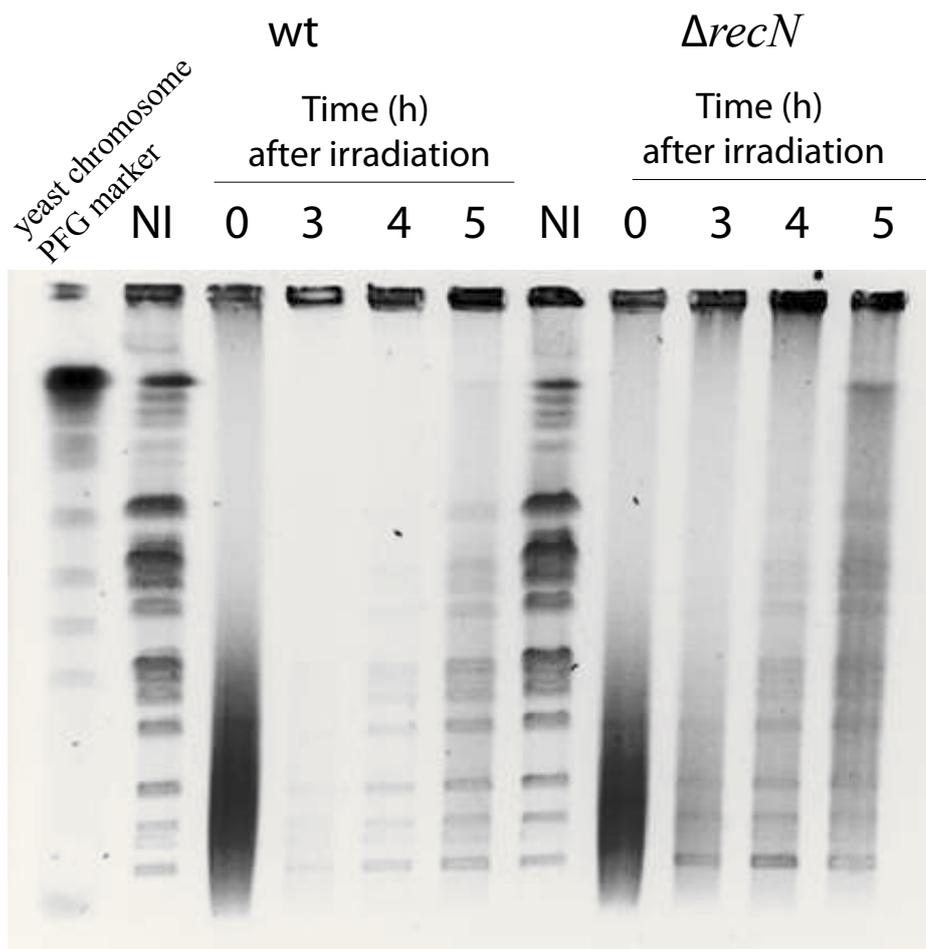
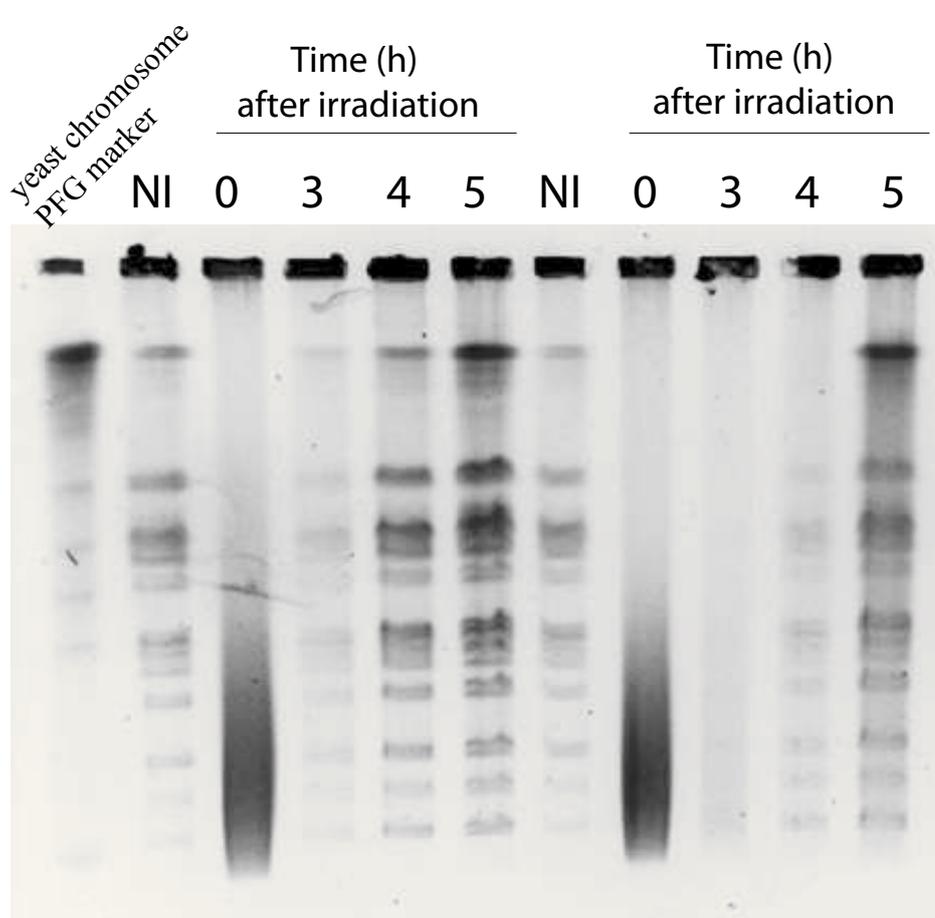


Fig 5. Expression of RecN and PprA proteins is induced after γ -irradiation. *D. radiodurans pprA::HA-kan recN::FLAG-cat* cell extracts from non-irradiated (NI) or cells exposed to 3.8 kGy γ -irradiation and incubated during the indicated periods were subjected to SDS-PAGE and analyzed by western blotting with anti-HA and anti-FLAG antibodies.



$\Delta pprA$

$\Delta pprA \Delta recN$

Fig 6. Kinetics of DNA DSB repair in wild type, $\Delta recN$, $\Delta pprA$, and $\Delta pprA \Delta recN$ bacteria followed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). PFGE shows *NotI* treated DNA from unirradiated cells (NI) and from irradiated cells (5 kGy) immediately after irradiation (time 0) and at the indicated post-irradiation incubation times (h).

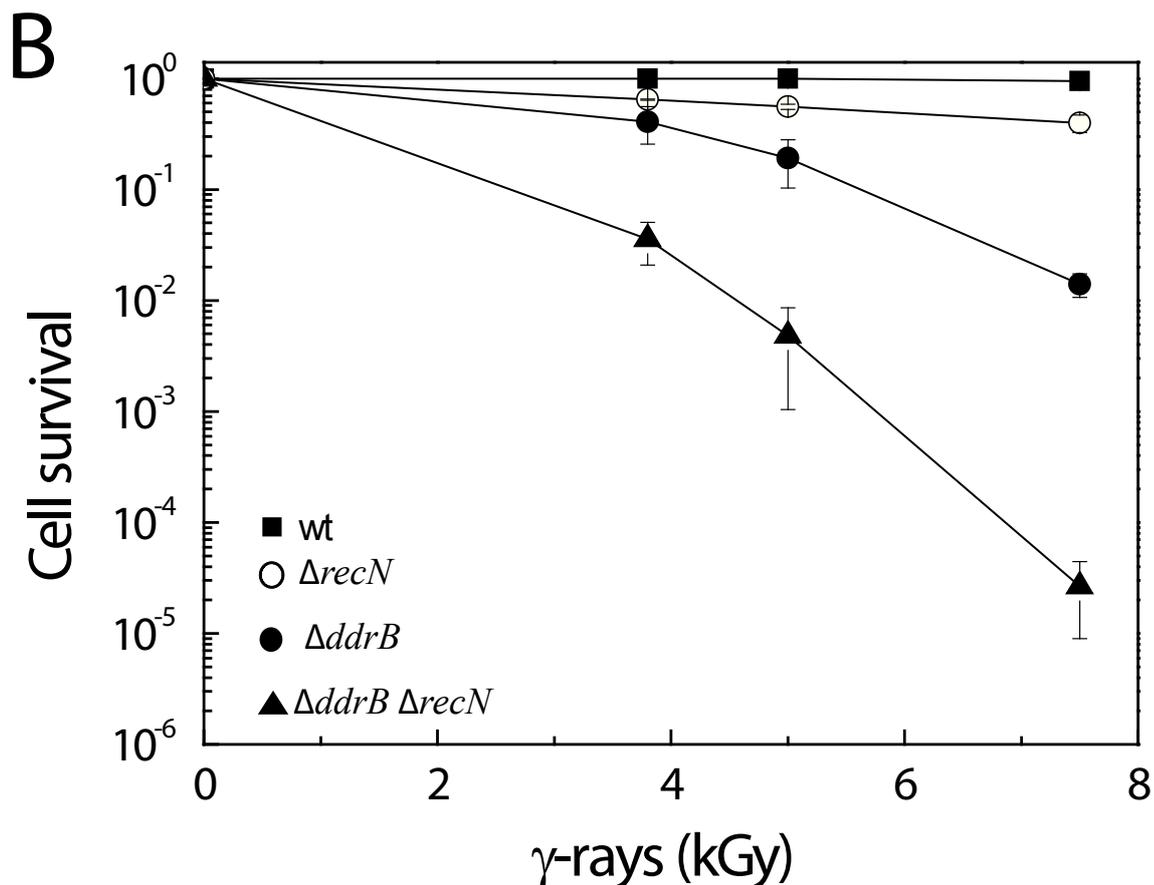
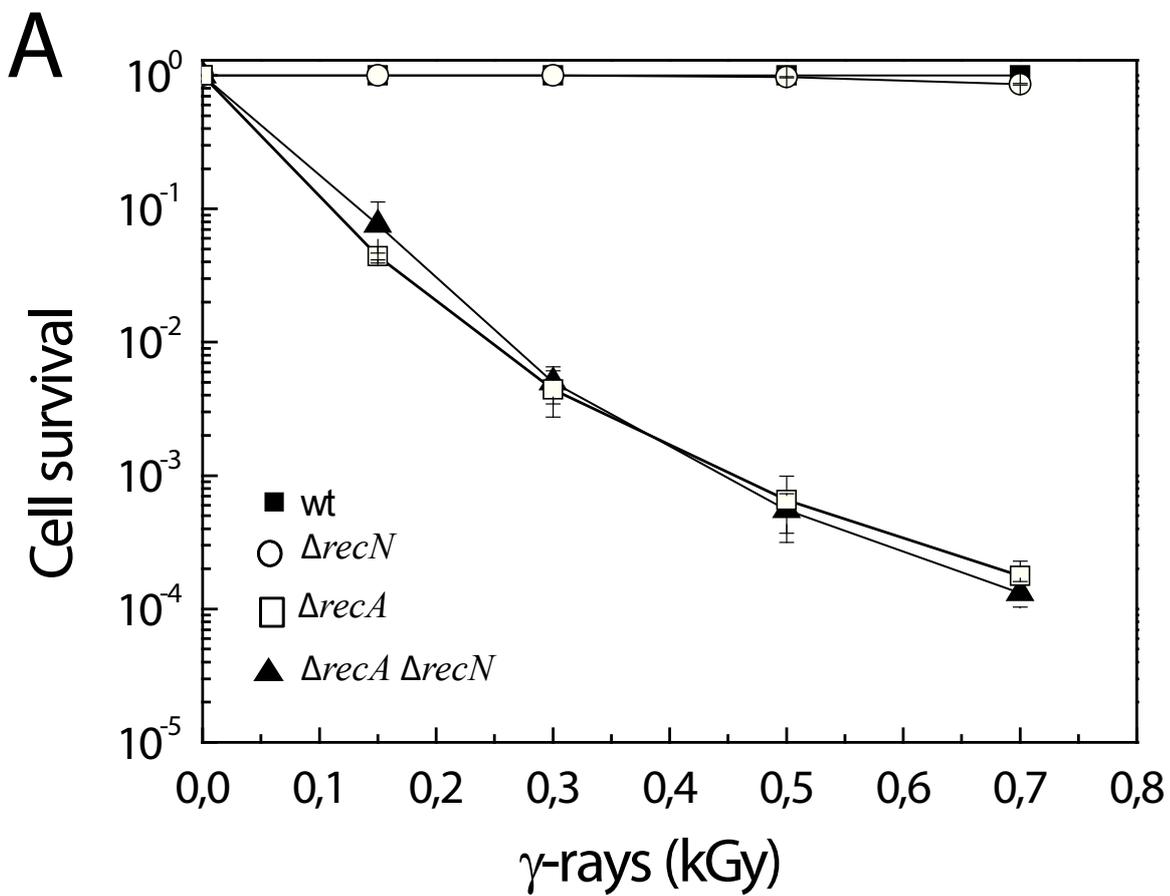


Fig 7. Survival to γ -irradiation of wild type, $\Delta recA$, $\Delta recN$, $\Delta recN \Delta recA$, $\Delta ddrB$ and $\Delta recN \Delta ddrB$ bacteria. Bacteria were exposed to γ -irradiation at doses indicated on the abscissa and survival was measured as described in the Materials and Methods. **A.** Wild type (closed squares), $\Delta recN$ (open circles), $\Delta recA$ (open squares), $\Delta recA \Delta recN$ (closed triangles). **B.** Wild type (closed squares), $\Delta recN$ (open circles), $\Delta ddrB$ (closed circles), $\Delta ddrB \Delta recN$ (closed triangles). The results are the average of at least three independent experiments.

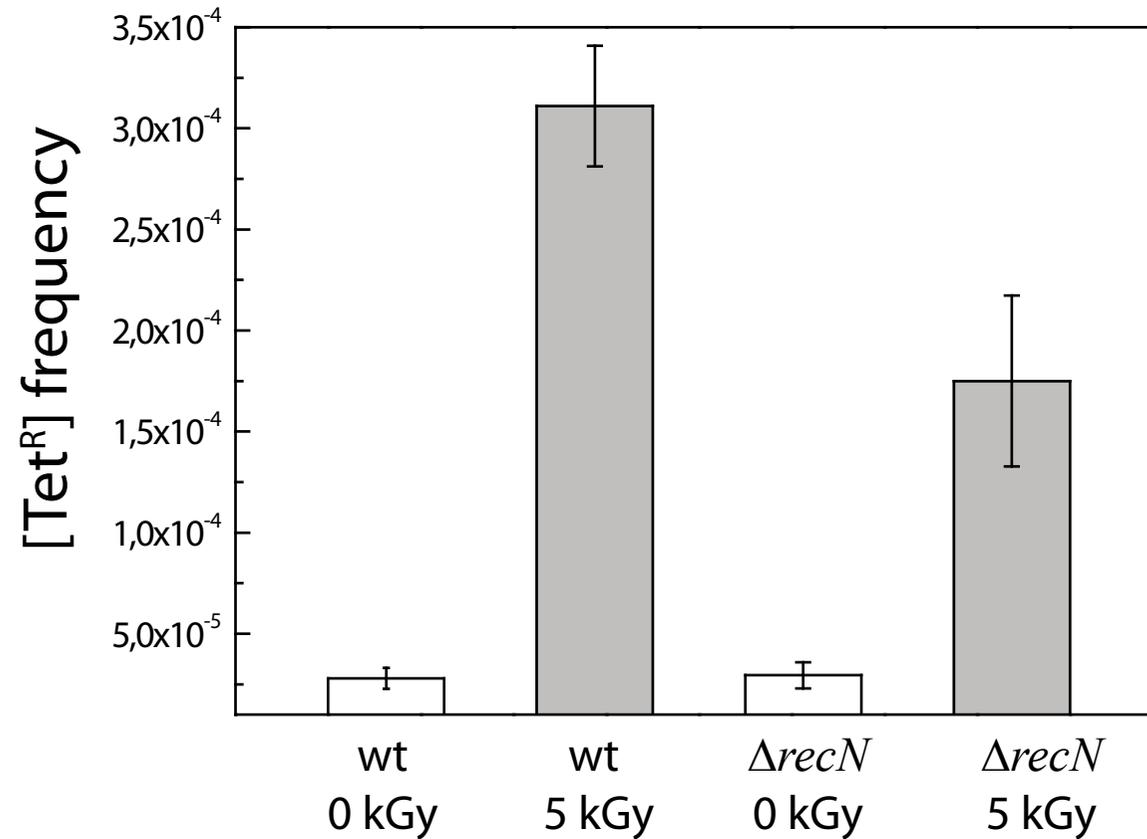


Fig 8. Induction of the recombination between 5'tetA chromosomal DNA and 3'tetA plasmid DNA after γ -irradiation decreased in the absence of the RecN protein. Mean values of [Tet^R] frequencies in wild type and $\Delta recN$ bacteria, all containing the p15002 plasmid, are calculated from at least 6 independent experiments.

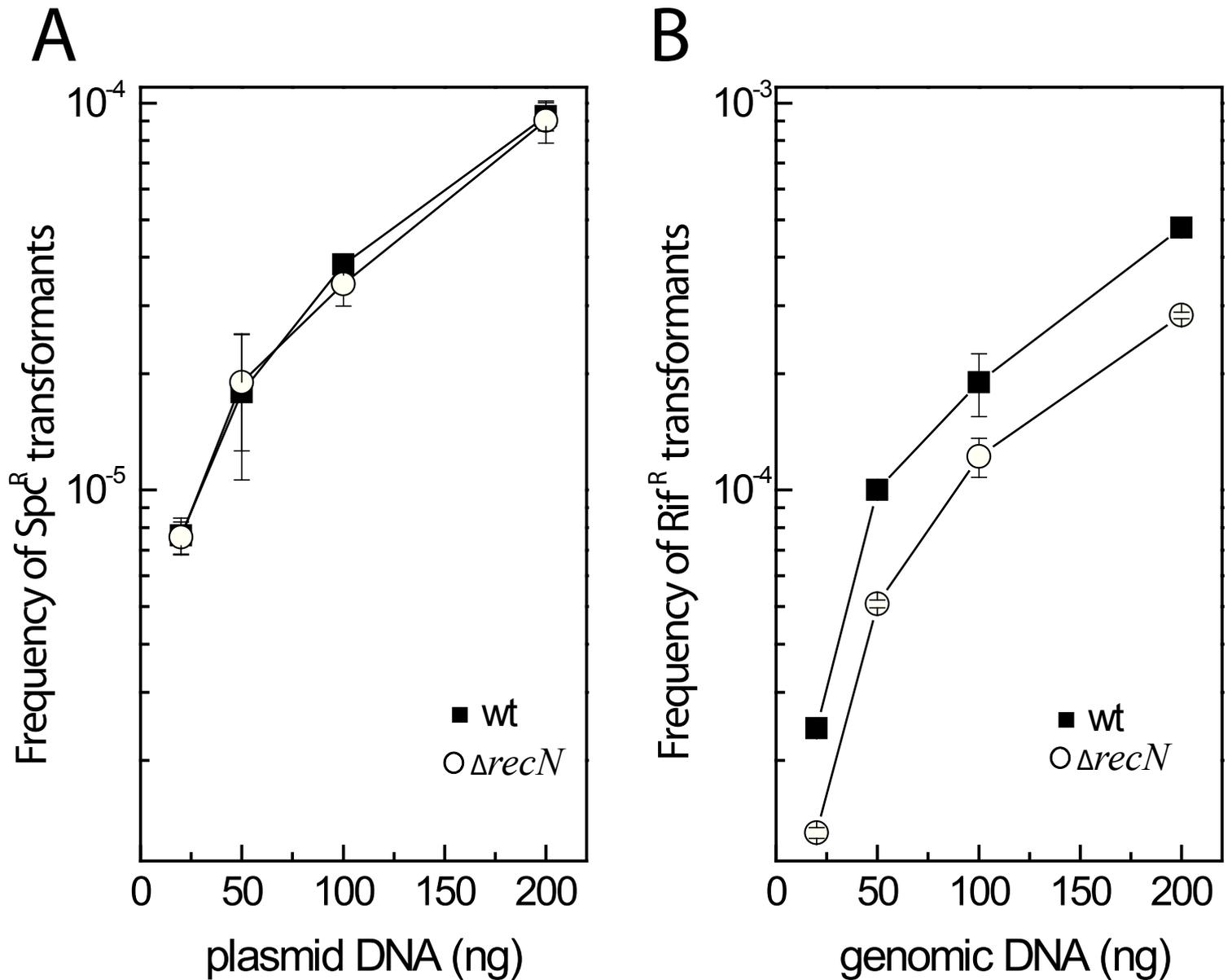
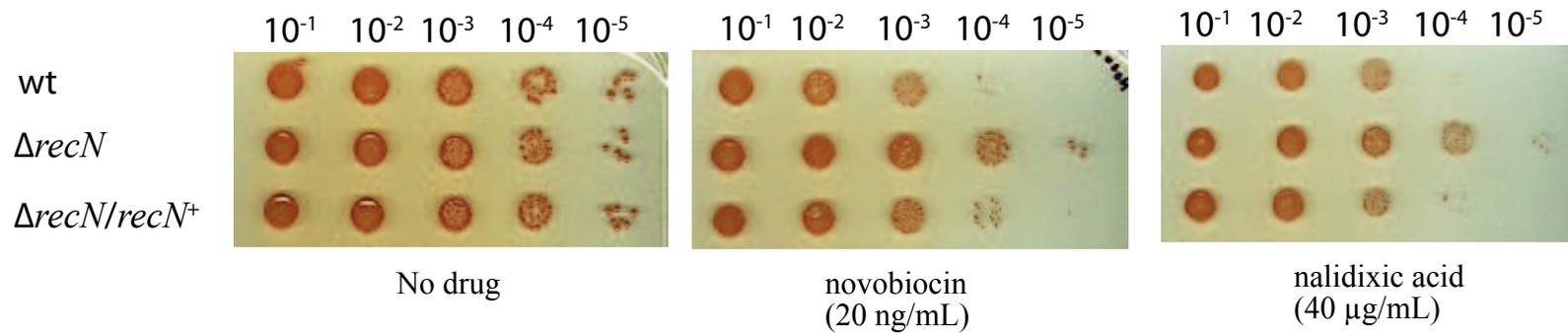
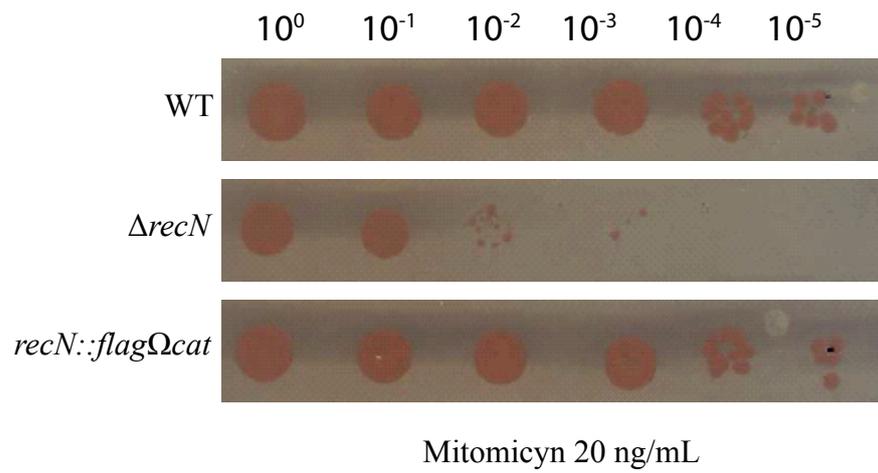


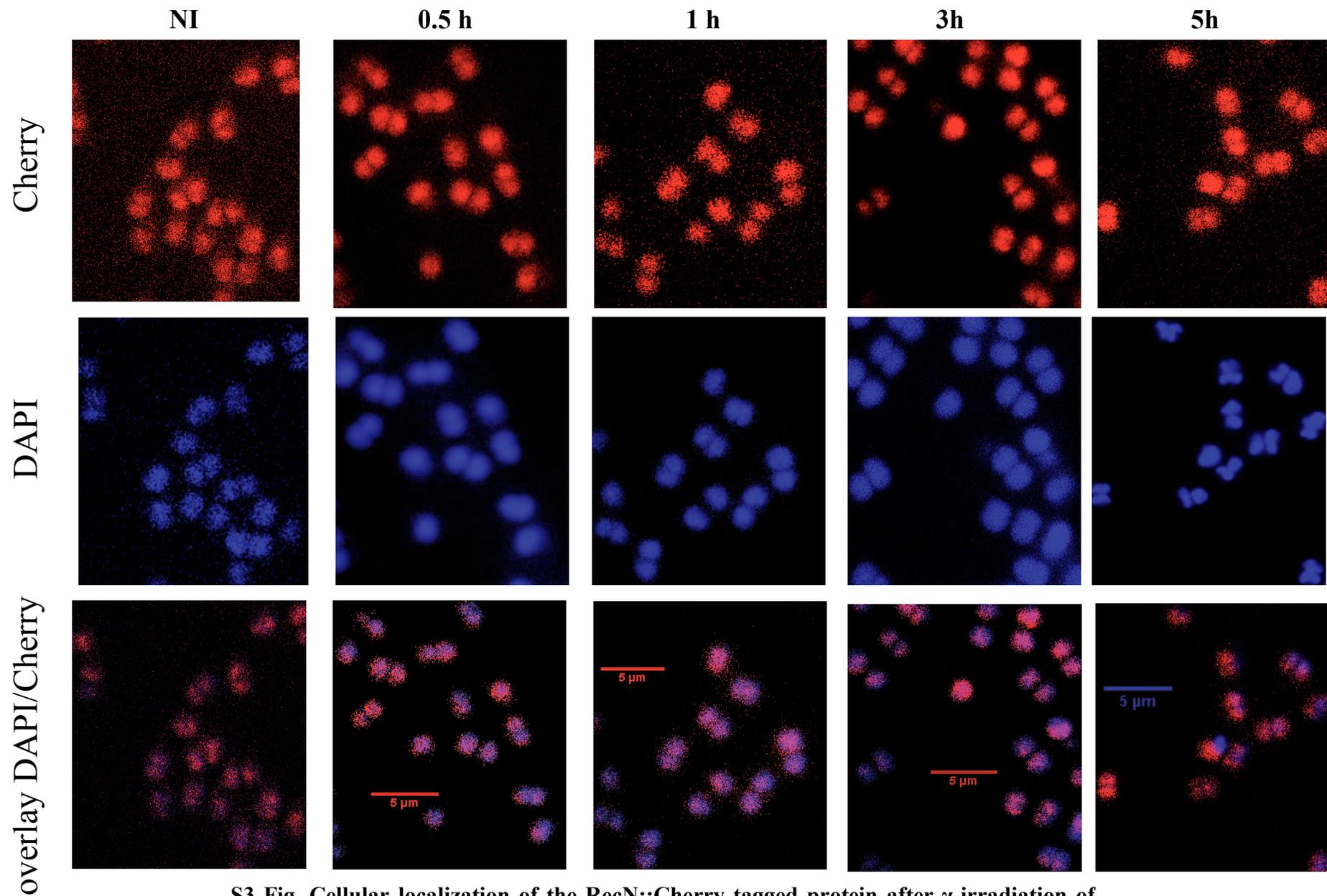
Fig 9. Frequencies of plasmid and chromosomal transformation in wild type and $\Delta recN$ bacteria. Wild type (closed square) and $\Delta recN$ (open circle) bacteria were transformed with different concentrations of **A.** p11559 plasmid DNA conferring spectinomycin (Spc) resistance or **B.** genomic DNA purified from GY11733 (source of genomic DNA conferring rifampicin resistance). Appropriate dilutions of the transformation mixture were plated on TGY plates to measure the number of viable cells and on TGY plates supplemented with spectinomycin or rifampicin to select transformants. Transformation frequencies were expressed as the number of transformants divided by the number of viable cells in the transformation mixtures. The results are the average of at least three independent experiments.



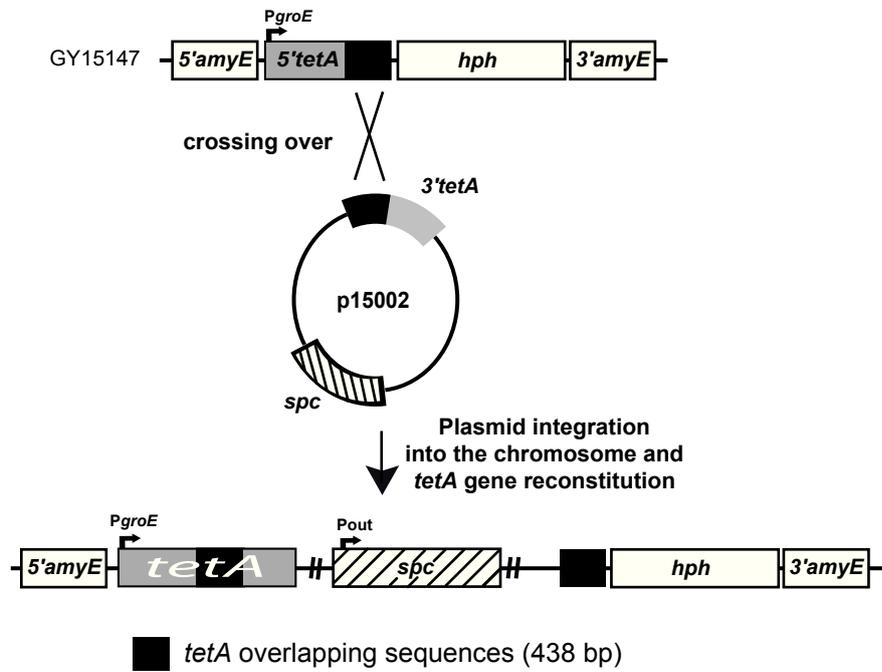
S1 Fig. Absence of RecN protein decreases sensitivity to gyrase inhibitors. Serial dilutions of cultures of wt, $\Delta recN$, $\Delta recN/recN^+$ were spotted on plates in the absence (no drug), or presence, of novobiocin (20 ng/mL) or nalidixic acid (40 μg/mL) and plates were incubated at 30 °C for 5 days.



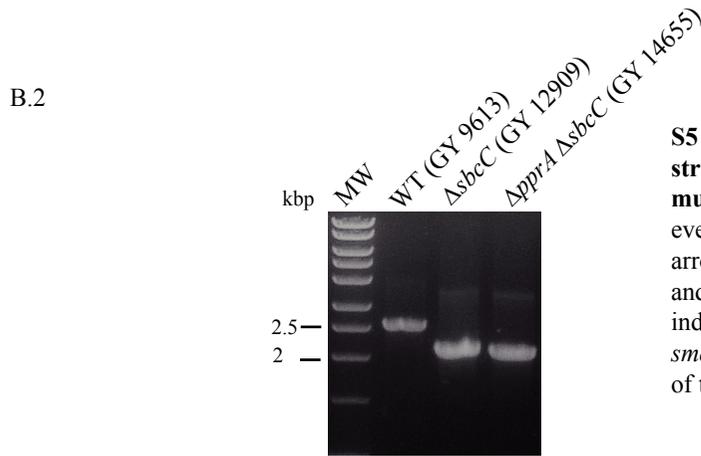
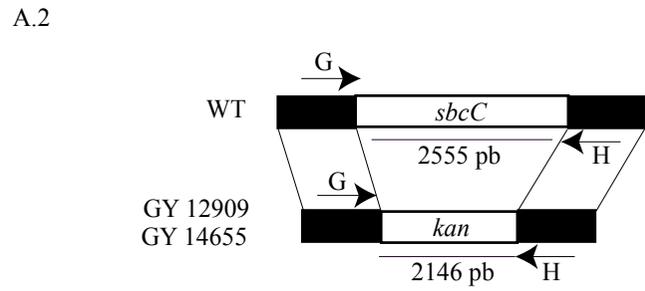
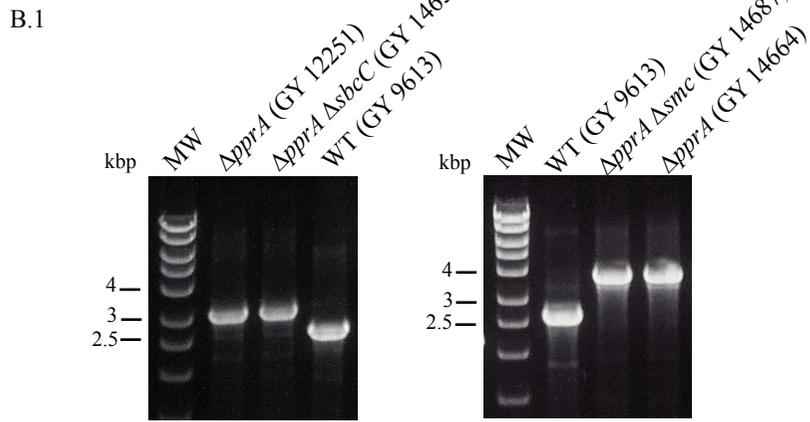
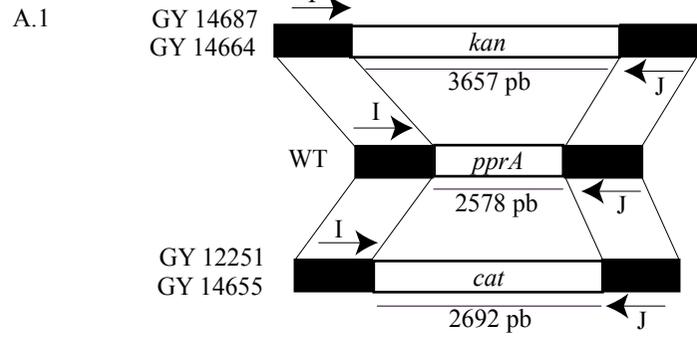
S2 Fig. The tagged RecN::FLAG protein is functional. Serial dilutions of bacterial cultures of wild type, *ΔrecN* and *recN::flag-cat* were spotted on a plate containing 20 ng/mL of MMC.



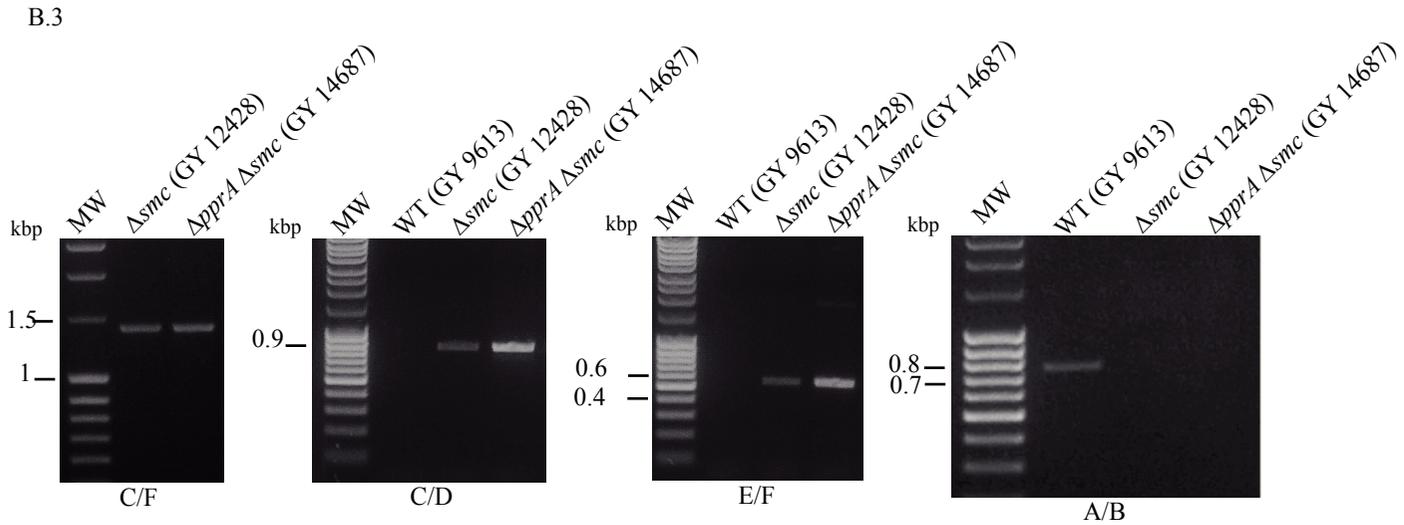
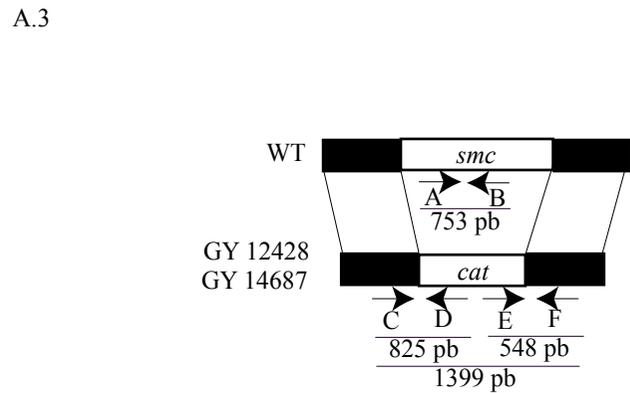
S3 Fig. Cellular localization of the RecN::Cherry tagged protein after γ -irradiation of *D. radiodurans* cells. Bacteria expressing a RecN::Cherry fusion protein recovering from γ irradiation (3.8 kGy) were visualized by fluorescence microscopy at the indicated times of post-irradiation incubation. Blue spots show DNA stained with DAPI. Red spots show the RecN::Cherry proteins. Overlays of DAPI/Cherry images are also shown.



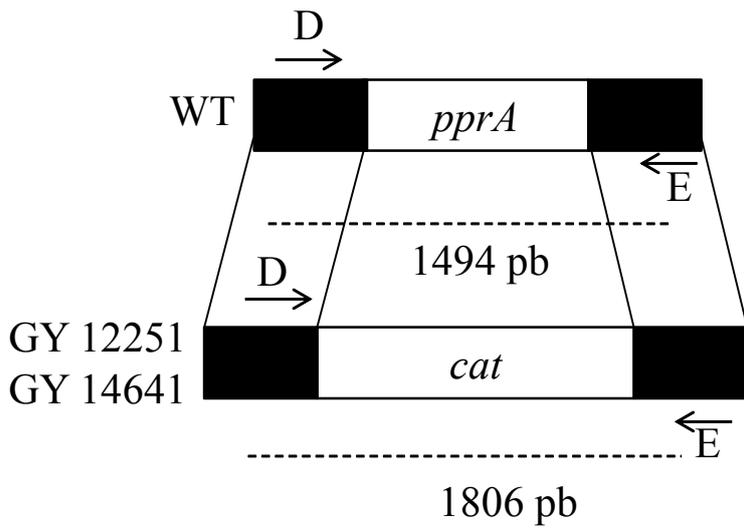
S4 Fig. Schematic representation of the recombination assay between chromosomal and plasmid DNA (from [32]).



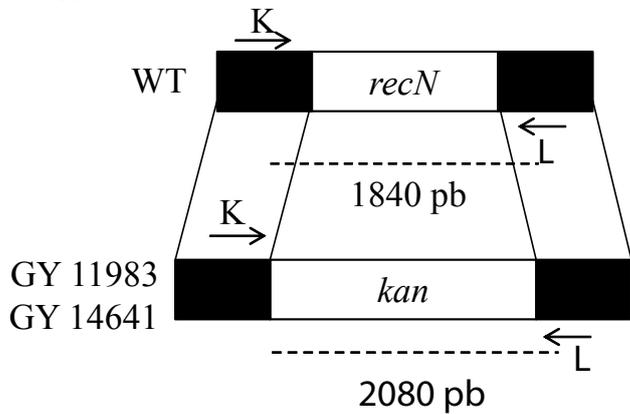
S5 Fig. Schematic representation and test of the genetic structure and the purity of the deletion-substitution mutants. **A.** Schematic representation of the allele replacement events in the *pprA* (A.1), *sbcC* (A.2) and *smc* (A.3) genes. Short arrows indicate the position of primers used for diagnostic PCR and expected sizes of wild type and mutant PCR fragments are indicated. **B.** PCR-analysis of Δ *pprA* (B.1), Δ *sbcC* (B.2) and Δ *smc* (B.3) candidates. The marker sizes are indicated on the left of the PCR-analysis gels.



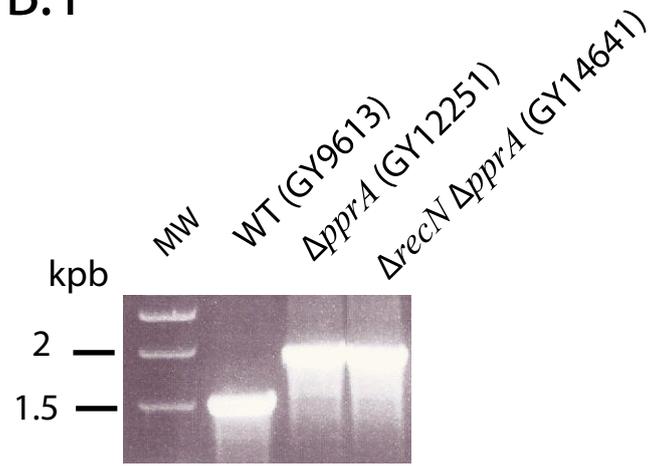
A.1



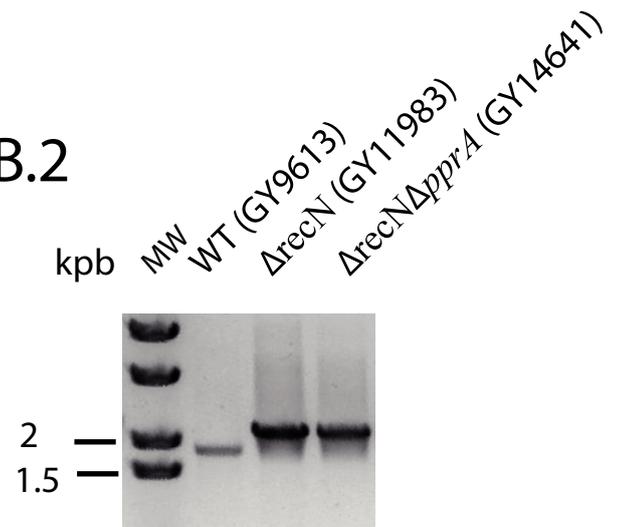
A.2



B.1



B.2



S6 Fig. Schematic representation and test of the homozygosity of the $\Delta recN$ and $\Delta recN \Delta pprA$ mutants. **A.** Schematic representation of the allele replacement events in the *pprA* (A.1) and *recN* (A.2) genes. Short arrows indicate the position of primers used for diagnostic PCR. **B.** PCR-analysis of $\Delta pprA$ (B.1) and $\Delta recN$ (B.2) candidate mutants.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES:

1°) Le mutant Δ recN n'est pas affecté dans la réparation des cassures double brin de l'ADN par ESDSA.

Nos résultats suggèrent que la protéine RecN est impliquée dans un mécanisme de réparation de l'ADN dépendant de RecA, à savoir la recombinaison homologue et/ou l'ESDSA. Nous avons montré *in vivo* qu'après exposition des cellules au rayonnement γ (5kGy), l'absence de la protéine RecN diminue d'un facteur 2, la fréquence de recombinaison entre de l'ADN chromosomique et de l'ADN plasmidique. Nous avons aussi montré qu'après exposition des cellules au rayonnement γ , l'absence de RecN ne diminue que légèrement la survie de *D. radiodurans* et un léger retard d'environ 1h de la reconstitution du génome est observé dans le mutant Δ recN. Ces données suggèrent que la réparation des cassures double brin de l'ADN par ESDSA est efficace. Afin d'analyser si la protéine RecN intervient également dans la réparation des cassures double brin de l'ADN par ESDSA, il faudrait déterminer si l'absence de la protéine RecN affecte la synthèse massive d'ADN mise en place au cours de ce mécanisme, après exposition des cellules au rayonnement γ (5 kGy). Pour cela, nous avons comparé le taux de synthèse d'ADN à différents temps, après exposition des cellules au rayonnement γ (5 kGy) dans la souche sauvage et le mutant Δ recN. Nos premiers résultats (**Figure 58**) indiquent que l'absence de la protéine RecN n'affecte pas la synthèse massive mise en place lors de la réparation des cassures double brin de l'ADN par le mécanisme ESDSA, suggérant que la protéine RecN ne soit pas impliquée dans ce mécanisme de réparation. En revanche, cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et mérite donc d'être reproduite.

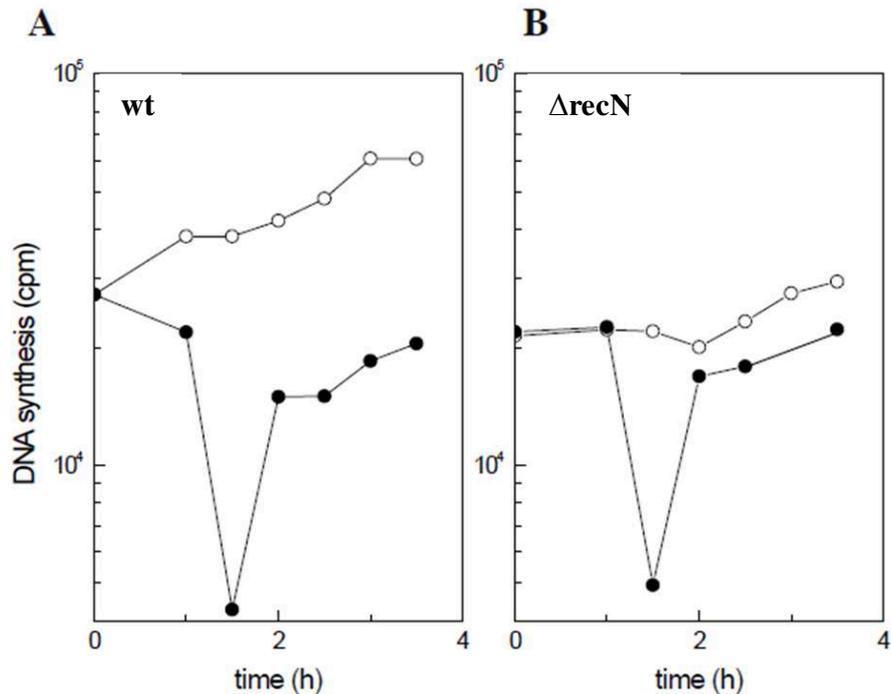


Figure 58: Mesures de la synthèse d'ADN dans la souche sauvage A) et le mutant ΔrecN B) après exposition des cellules au rayonnement γ (5 kGy). Des aliquots sont prélevés à différents temps après irradiations et les cellules sont incubées en présence de thymidine tritiée (^3H) pendant 15 min afin de mesurer le taux de synthèse global de l'ADN après que les souches soient exposées (cercles noirs) ou non (cercles blancs) au rayonnement γ (5 kGy).

Protocole de mesure de la synthèse d'ADN au cours du processus de réparation des cassures double brin de l'ADN par ESDSA:

Des cellules en phase exponentielle de croissance ($A_{650\text{nm}}$: 0.3) sont concentrées ($A_{650\text{nm}}$: 20) puis exposées ou non à une doses de 5 kGy de rayonnement γ . Les cellules sont ensuite diluées dans du milieu TGYA (0,5% tryptone, 0,2% de dextrose, 0,15% d'extrait de levure) à une $A_{650\text{nm}}$: 0,2 et incubées à 30°C. A différents temps, 0,5 mL de culture sont prélevés et mélangés pendant 15 min avec 0,1 mL de milieu TGYA préchauffé contenant 4,8 μCi [methyl- ^3H] thymidine (PerkinElmer, activité spécifique 70-90 Ci/mmol). 2mL de TCA 10 % froid sont ajoutés à l'échantillon pour arrêter la réaction et les échantillons sont gardés dans la glace pendant 1h, puis collectés par filtration (vacuum filtration) sur des filtres Whatman GF/C, suivie de 2 lavages avec 5mL de TCA 5% et 2 lavages avec 5mL d'éthanol 96%. Les filtres sont séchés pendant 10 min sous une lampe et placés dans 4 mL de liquide à scintillation, puis placés dans un compteur à scintillation (Packard, TRI-carb 1600 TR).

2°) L'expression de la protéine RecN n'est pas régulée par la protéine DdrI.

Récemment l'équipe de Hua a montré qu'en comparaison avec la souche sauvage, le gène *recN* est 3 fois moins exprimé dans le mutant $\Delta ddrI$ en conditions standards et 2 fois moins exprimé dans le mutant $\Delta ddrI$ en réponse au rayonnement γ (Yang et al., 2016), suggérant que le régulateur transcriptionnel DdrI soit impliqué dans la régulation de l'expression de *recN*.

Cependant, lors de notre étude précédente (Meyer et al., 2018), nous avons démontré par des analyses de RT-qPCR qu'en conditions standards, l'expression du gène *recN* n'est pas dérégulée dans le mutant $\Delta ddrI$. Ici nous analysons l'expression de la protéine RecN par western-immunoblot avant et après exposition des cellules au rayonnement γ (3,8 kGy) (**Figure 59**). Les résultats montrent qu'après exposition des cellules au rayonnement γ , l'expression de la protéine RecN n'est pas contrôlée par le régulateur transcriptionnel DdrI et suggère qu'un autre facteur soit impliqué dans la régulation de son expression.

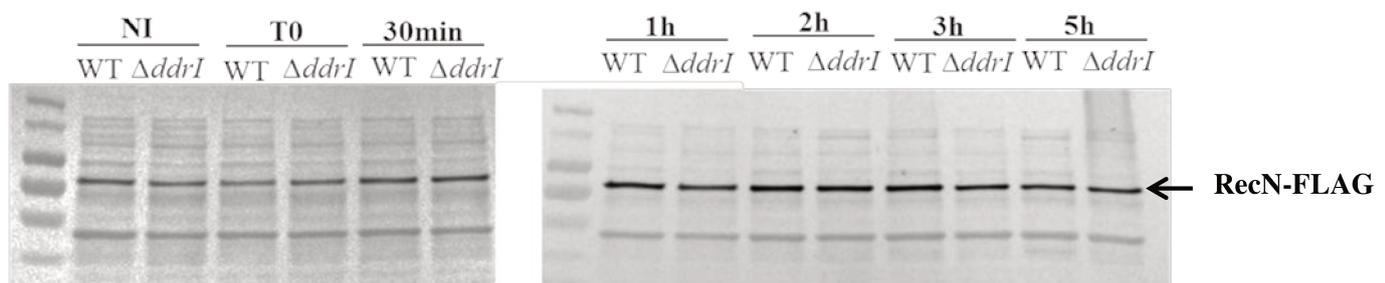


Figure 59: Analyses par western-immunoblot de l'expression de la protéine RecN-FLAG dans une souche sauvage et le mutant $\Delta ddrI$ après exposition des cellules au rayonnement γ (3,8 kGy). Des extraits protéiques issus de cellules exprimant la protéine RecN-FLAG et ayant été exposées ou non (NI) au rayonnement γ (3,8 kGy) sont analysés par western immunoblot à l'aide d'anticorps anti-FLAG.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES:

La bactérie *D. radiodurans* est l'un des organismes les plus radiorésistants connus à ce jour. Après exposition des cellules au rayonnement γ , elle est capable de reconstituer en quelques heures, son génome à partir de centaines de fragments d'ADN. Les cassures double brin de l'ADN, générées par l'exposition au rayonnement γ , peuvent être réparées chez *D. radiodurans* par 2 voies de réparation des cassures de l'ADN dépendantes de la protéine RecA, la recombinaison homologue et l'ESDSA, un mécanisme d'appariement simple brin dépendant d'une synthèse massive d'ADN et par une voie indépendante de la protéine RecA mais dépendante de la protéine DdrB, le SSA, un mécanisme d'appariement simple brin de régions d'ADN complémentaires, (Slade et al., 2009; Zahradka et al., 2006; Bentchikou et al., 2010; Bouthier de la Tour et al., 2011).

Les études antérieures ont montré que la protéine PprA, une protéine spécifique des *Deinococcaceae*, est fortement induite après exposition des cellules au rayonnement γ et joue un rôle clé dans la radiorésistance de *D. radiodurans* (Tanaka et al., 2004). L'absence du gène *pprA* sensibilise fortement *D. radiodurans* à l'exposition aux agents endommageant l'ADN (rayonnements γ , UV, mitomycine C) (Tanaka et al., 2004; Devigne et al., 2013) ainsi qu'aux inhibiteurs de l'ADN gyrase (acide nalidixique et novobiocine) (Devigne et al., 2016; Kota et al., 2014). Après exposition au rayonnement γ (3.8 kGy), la protéine PprA-HA est localisée au niveau du nucléoïde puis apparaît sous forme d'un fin filament reliant les cellules filles (**Figure 27**). Des analyses de la morphologie des cellules par microscopie à épifluorescence, montrent que 7h après exposition au rayonnement γ (3,8 kGy), 90% des cellules du mutant Δ *pprA* sont anucléées ou présentent des défauts de ségrégation de l'ADN (Devigne et al., 2013). In vivo, PprA interagit avec l'ADN gyrase et stimule in vitro l'activité de décaténation de l'ADN gyrase (Devigne et al., 2016). L'ensemble de ces données suggère que PprA, via son interaction physique et fonctionnelle avec l'ADN gyrase, est impliquée dans la ségrégation des chromosomes après exposition des cellules au rayonnement γ et nous a conduit à analyser les interactions génétiques possibles entre PprA et les protéines de la famille SMC. En effet, chez les bactéries telles que *E. coli* et *B. subtilis*, les protéines de la famille SMC jouent un rôle important dans l'organisation et la dynamique des chromosomes telles que la condensation du nucléoïde, la cohésion des chromatides sœurs et la ségrégation des chromosomes (pour revue voir Graumann & Knust, 2009).

D. radiodurans possède 3 protéines de la famille SMC : SMC, SbcC et RecN. Alors que les doubles mutants $\Delta\text{pprA}\Delta\text{smc}$ et $\Delta\text{pprA}\Delta\text{sbcC}$ augmentent modérément la sensibilité du simple mutant ΔpprA , de manière intéressante, nous avons montré que la délétion du gène *recN* supprime le phénotype de sensibilité du mutant ΔpprA aux rayonnements γ , UV, à la mitomycine C ou encore aux inhibiteurs de l'ADN gyrase (acide nalidixique et novobiocine). L'absence de la protéine RecN supprime également les défauts de ségrégation observés dans les cellules du mutant ΔpprA après exposition au rayonnement γ (3,8 kGy).

L'absence de la protéine PprA n'augmente ni la radiosensibilité ni la cinétique très lente de réparation de l'ADN du mutant ΔrecA (Tanaka et al., 2004; Devigne et al., 2013, **Figure 26 B**) suggérant que la protéine PprA est impliquée dans un mécanisme RecA dépendant de réparation des cassures double brin de l'ADN. Il a par ailleurs été montré que le mutant ΔpprA n'est pas affecté dans la synthèse massive d'ADN, mise en place lors de la réparation des cassures double brin de l'ADN par le mécanisme ESDSA (**Figure 26 A**) (Devigne et al., 2013). L'ensemble de ces données suggèrent que la protéine PprA est impliquée dans une voie de réparation des cassures double brin de l'ADN par recombinaison homologue.

Nous avons montré *in vivo* que chez *D. radiodurans*, l'absence de la protéine RecN n'augmente pas la radiosensibilité du mutant ΔrecA mais augmente celle du mutant ΔaddrB , suggérant que comme PprA, la protéine RecN n'est pas impliquée dans un mécanisme RecA indépendant de réparation des cassures de l'ADN. Des résultats préliminaires (**Figure 58**) suggèrent que les cellules dépourvues de la protéine RecN ne sont pas affectées dans la réparation des cassures de l'ADN par ESDSA. Le mutant ΔrecN est hypersensible au traitement par la mitomycine C, dont les dommages générés par cet agent génotoxique sont réparés par recombinaison homologue (Keyamura et al., 2013). Par ailleurs, il a été montré chez *D. radiodurans*, que la protéine RecN interagit physiquement avec la recombinaison RecA et stimule *in vitro* la formation de la D-loop et l'échange de brin médié par RecA (Uranga et al., 2017), suggérant que la protéine RecN comme chez *E. coli* ou *B. subtilis*, pourrait être impliquée dans la réparation des cassures double brin de l'ADN par recombinaison homologue (Lloyd, Picksley & Prescott, 1983; Wang & Smith, 1988).

En faveur de cette hypothèse, nous avons montré *in vivo* qu'après exposition des cellules au rayonnement γ (5kGy), l'absence de la protéine RecN diminue d'un facteur 2, la fréquence de recombinaison entre de l'ADN chromosomique et de l'ADN plasmidique. Nous avons également montré qu'en comparaison avec la souche sauvage, l'absence de RecN n'a aucun

effet sur la fréquence de transformation par de l'ADN plasmidique mais diminue d'un facteur 2 la fréquence de transformation par de l'ADN génomique.

Afin d'essayer de comprendre comment l'absence de la protéine RecN supprime l'ensemble des phénotypes des cellules dépourvues de la protéine PprA, nous proposons le modèle suivant sur le rôle des protéines RecA et PprA dans la réparation des cassures double brin de l'ADN par recombinaison homologe chez *D. radiodurans* (**Figure 60**).

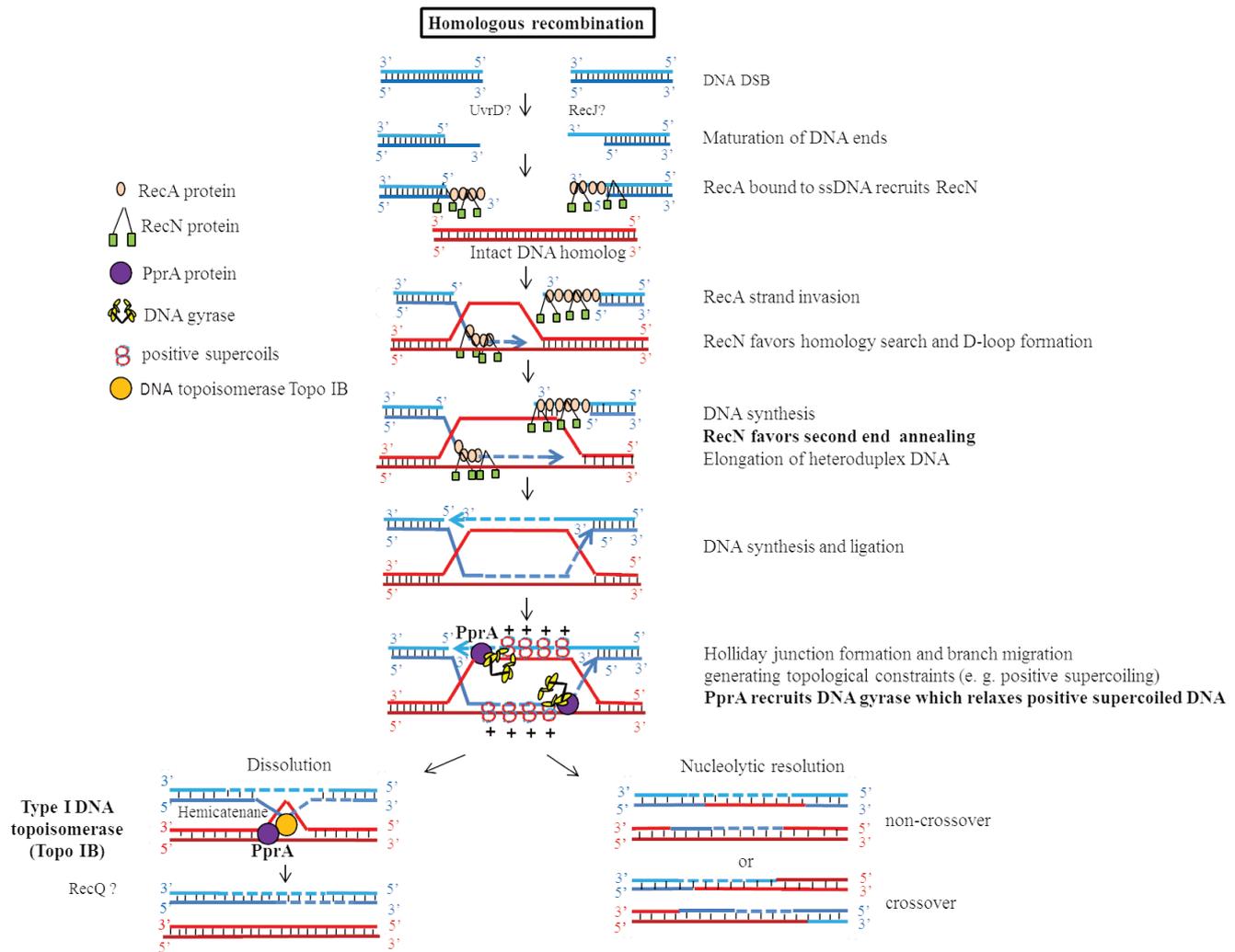


Figure 60: Rôle des protéines RecN et PprA dans la réparation des cassures double brin de l'ADN par recombinaison homologue chez *D. radiodurans* (adapté de Wright, Shah & Heyer, 2018).

Après la reconnaissance des cassures double brin de l'ADN, l'hélicase UvrD et l'exonucléase RecJ permettraient l'ouverture de la double hélice de l'ADN et la dégradation de l'extrémité 5' de l'ADN ce qui génère des extrémités 3' simple brin débordantes sur lesquelles la recombinase RecA se fixe pour former un nucléofilament. La protéine RecA recrute directement la protéine RecN, qui grâce à son rôle de cohésine entre les chromatides sœurs,

favorise l'étape de recherche d'homologie et d'envahissement de l'ADN double brin homologue, par les extensions 3' simple brin, chargées de la protéine RecA (Vickridge et al., 2017). Une synthèse d'ADN est suivie par l'extension de l'ADN hétéroduplex puis la protéine RecN recrutée par RecA, favorise l'hybridation d'une seconde extrémité 3' simple brin avec le brin déplacé de la D-loop. Les brèches d'ADN sont ensuite comblées par la synthèse et la ligation de l'ADN, ce qui génère la formation de 2 jonctions de Holliday (structure composée de 4 brins d'ADN). La migration des jonctions de Holliday induit des contraintes topologiques de l'ADN dont un excès de surenroulement positif de l'ADN entre les jonctions. Chez *E. coli*, le relâchement du surenroulement positif de l'ADN est principalement effectué par les ADN topoisomérases de type II (l'ADN gyrase et l'ADN topoisomérase IV) (Khodursky et al., 2000). *D. radiodurans* est dépourvu d'ADN topoisomérase IV, ce qui nous amène à supposer que cette fonction soit réalisée par l'ADN gyrase et que la protéine PprA via son interaction physique avec l'ADN gyrase soit impliquée dans le recrutement de l'ADN gyrase entre les jonctions de Holliday afin de permettre le relâchement des supertours positif de l'ADN. Pour l'instant, seules les activités de surenroulement négatif et de décaténation de l'ADN gyrase de *D. radiodurans* ont été testées et mises en évidence *in vitro* (Devigne et al., 2016). Pour renforcer notre modèle, il faudrait démontrer que l'ADN gyrase de *D. radiodurans* se comporte comme les autres ADN gyrases et est capable de relâcher *in vitro* les supertours positifs dans l'ADN.

Par ailleurs, il a été montré que la protéine PprA interagit également physiquement avec une ADN topoisomérase I de type eucaryote (l'ADN topoisomérase IB), codée par le génome de *D. radiodurans*, et stimule son activité de relâchement des supertours négatifs (Kota et al., 2014b). Les ADN topoisomérases IB sont présentes chez tous les eucaryotes, alors qu'elles sont rarement retrouvées chez les bactéries, dans lesquelles elles sont présentes dans une forme plus courte et proches de l'ADN topoisomérase IB du virus de la vaccine (Krogh & Shuman, 2002). Il a été montré que les ADN topoisomérases IB eucaryotes ainsi que celle de la thaumarchée *Candidatus Caldiarchaeum subterraneum* relâchent à la fois l'ADN surenroulé négativement et l'ADN surenroulé positivement (Dahmane et al., 2016). De même, Krogh et al. (Krogh & Shuman, 2002) montrent que l'ADN topoisomérase IB de *D. radiodurans* relâche l'ADN surenroulé négativement et indique, sans montrer les résultats, qu'elle serait également capable de relâcher l'ADN surenroulé positivement (Krogh & Shuman, 2002). Il est donc possible que le recrutement de la topoisomérase IB par la protéine PprA facilite également le relâchement des contraintes topologiques engendrées par la

migration des jonctions de Holliday au cours de la réparation des cassures double brin de l'ADN par recombinaison homologue. Cependant, le mutant de délétion Δ topB de *D. radiodurans* a pu être facilement construit ce qui prouve que le gène topB n'est pas essentiel à la survie cellulaire en conditions standards et son absence ne sensibilise pas *D. radiodurans* à l'exposition au rayonnement γ , suggérant que l'ADN topoisomérase IB ne joue pas un rôle majeur dans la physiologie de *D. radiodurans* (communication personnelle de Claire Bouthier de la Tour).

La résolution des jonctions de Holliday peut être réalisée ensuite par 2 mécanismes différents: la dissolution qui nécessite la résolution d'un hémicaténane pour permettre la séparation complète des chromatides sœurs ou la résolution nucléolytique, catalysée par la protéine RuvC, qui entraîne la formation ou non de crossing-over.

Chez *E. coli*, l'ADN topoisomérase III avec l'hélicase RecQ est impliquée dans la résolution des hémicaténanes générés lors de la réparation de l'ADN par recombinaison homologue (Harmon, DiGate & Kowalczykowski, 1999). *D. radiodurans* est dépourvue d'ADN topoisomérase III, suggérant que cette fonction soit assurée par l'une des deux ADN topoisomérases de type I présentes chez *D. radiodurans*: l'ADN topoisomérase IA ou l'ADN topoisomérase IB. L'interaction physique de PprA avec l'ADN topoisomérase IB pourrait favoriser le recrutement de cette dernière et la résolution des hémicaténanes. La question de la nature de l'hélicase associée reste également ouverte.

Après exposition des cellules au rayonnement γ , la présence de la protéine RecN favoriserait la réparation des cassures de l'ADN par recombinaison homologue, en favorisant l'étape d'hybridation d'une seconde extrémité 3'simple brin avec le brin déplacé de la D-loop. La migration et la résolution des jonctions de Holliday qui entraînent la formation de nombreuses contraintes topologiques (dont l'accumulation de supertours positifs de l'ADN entre les jonctions de Holliday, la formation d'hémicaténane etc), nécessiteraient alors la présence de la protéine PprA qui grâce à ses interactions physiques et/ou fonctionnelles avec les ADN topoisomérases (ADN gyrase, ADN topoisomérase Topo IB) jouerait alors un rôle important dans l'achèvement de la réparation de l'ADN. Dans les cellules dépourvues de la protéine PprA, la difficulté des cellules à résoudre ces contraintes topologiques de l'ADN, générées lors des dernières étapes de la réparation de l'ADN par recombinaison homologue, pourrait expliquer les défauts de ségrégation de l'ADN observés par microscopie à épifluorescence après exposition des cellules au rayonnement γ . En l'absence de la protéine RecN, la réparation des cassures double brin de l'ADN serait majoritairement effectuée par le

mécanisme ESDSA, qui n'entraîne pas la formation de jonction de Holliday, ce qui générerait moins de contraintes topologiques de l'ADN et ne nécessiterait donc pas la présence de la protéine PprA pour favoriser leur résolution grâce au recrutement d'ADN topoisomérases. Il faut cependant garder à l'esprit que PprA est une protéine pléiotropique, qui agit probablement à différents niveaux de la radiorésistance (protection de la dégradation de l'ADN, stimulation de la ligation des fragments d'ADN, générés après exposition des cellules au rayonnement γ etc) (Narumi et al., 2004).

L'absence de RecN ne diminue que légèrement la survie de *D. radiodurans* et renforce donc l'hypothèse que la majorité des cassures double brin de l'ADN sont réparées par le mécanisme ESDSA chez *D. radiodurans* et suggèrent que la voie de réparation des cassures de l'ADN par recombinaison homologue soit nécessaire pour réparer les cassures double brin de l'ADN lorsque celles-ci sont en nombre très important dans la cellule et que l'ensemble des mécanismes de réparation de l'ADN est mobilisé dans la cellule.

Par ailleurs, les expériences de microscopie à épifluorescence, suggère que la protéine RecN est également impliquée dans la compaction et la ségrégation de l'ADN après exposition des cellules au rayonnement γ . Les défauts de compaction observés sont en accord avec des expériences *in vitro*, démontrant que chez *D. radiodurans*, RecN est une protéine cohésine-like, qui permet de garder côte à côte les fragments d'ADN (Reyes et al., 2010).

Enfin, dans cette étude, nous avons également montré que l'expression de la protéine RecN est induite en réponse à l'exposition des cellules au rayonnement γ . Chez *E. coli*, des analyses transcriptomiques montrent que l'expression du gène *recN* est fortement induite, d'une manière dépendante de LexA, après exposition des cellules au rayonnement UV (induction d'un facteur 20 après exposition des cellules à une dose de 40 J/m²) (Courcelle et al., 2001). Chez *D. radiodurans*, des études suggèrent que les régulateurs transcriptionnels LexA2, DrRRA, DdrI et IrrI ne sont pas impliqués dans l'induction de l'expression de *recN* après exposition des cellules au rayonnement γ (Sheng et al., 2004; Wang et al., 2008; Lu et al., 2011; Meyer et al., 2018). De plus, aucun site RDRM n'a été identifié en amont de la séquence codante du gène *recN*, suggérant que le répresseur transcriptionnel DdrO ne soit pas impliqué dans la régulation de l'expression du gène *recN*. Dans un premier temps, il faudrait comparer après exposition des cellules à un stress génotoxique, la régulation de l'expression du gène *recN* dans la souche sauvage et le mutant Δ lexA1 et/ou le double mutant Δ lexA1 Δ lexA2. Si ces deux régulateurs transcriptionnels ne sont pas impliqués dans le

contrôle de l'expression du gène *recN*, nous pourrions utiliser 2 approches afin de déterminer le ou les facteurs impliqués dans la régulation de l'expression du gène *recN*,: 1) in vitro par la technique de « promoter DNA-affinity capture » (Lipscomb et al., 2009), à l'aide du promoteur de ce gène et des extraits protéiques préparés à partir de cellules cultivées en l'absence ou en présence de stress génotoxique (rayonnement γ , mitomycine C). 2) Grâce aux outils génétiques disponibles chez *D. radiodurans*, dont le principe repose sur le criblage in vivo d'une banque de mutants de transposition construite dans la souche exprimant la fusion transcriptionnelle ($P_{recN}::lacZ$) et par le criblage sur boîte X-gal de mutants dérégulés en l'absence ou en présence de stress génotoxique suivie de l'identification des gènes inactivés et de l'analyse de la fonction des gènes identifiés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

Références bibliographiques:

- AGARI, Y., KASHIHARA, A., YOKOYAMA, S., KURAMITSU, S. & SHINKAI, A. (2008). Global gene expression mediated by *Thermus thermophilus* SdrP, a CRP/FNR family transcriptional regulator. *Mol Microbiol* 70, 60-75.
- AGARI, Y., KURAMITSU, S. & SHINKAI, A. (2010). Identification of novel genes regulated by the oxidative stress-responsive transcriptional activator SdrP in *Thermus thermophilus* HB8. *FEMS Microbiol Lett* 313, 127-34.
- AGARWAL, N. & BISHAI, W. R. (2009). cAMP signaling in *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Exp Biol* 47, 393-400.
- AIBA, H. (1983). Autoregulation of the *Escherichia coli* *crp* gene: CRP is a transcriptional repressor for its own gene. *Cell* 32, 141-9.
- AKHTER, Y., TUNDUP, S. & HASNAIN, S. E. (2007). Novel biochemical properties of a CRP/FNR family transcription factor from *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Med Microbiol* 297, 451-7.
- AKHTER, Y., YELLABOINA, S., FARHANA, A., RANJAN, A., AHMED, N. & HASNAIN, S. E. (2008). Genome scale portrait of cAMP-receptor protein (CRP) regulons in mycobacteria points to their role in pathogenesis. *Gene* 407, 148-58.
- ALBUS, A. M., PESCI, E. C., RUNYEN-JANECKY, L. J., WEST, S. E. & IGLEWSKI, B. H. (1997). Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 179, 3928-35.
- ALLEVA, J. L., ZUO, S., HURWITZ, J. & DOETSCH, P. W. (2000). In vitro reconstitution of the *Schizosaccharomyces pombe* alternative excision repair pathway. *Biochemistry* 39, 2659-66.
- ALMIRON, M., LINK, A. J., FURLONG, D. & KOLTER, R. (1992). A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev* 6, 2646-54.
- ANDERSON, A. W., H.C. NORDON, R.F. CAIN, G. PARRISH G. DUGGAN. (1956). Studies on a radioresistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food Technol* 10, 575-578.
- ANJUM, M. F., GREEN, J. & GUEST, J. R. (2000). YeiL, the third member of the CRP-FNR family in *Escherichia coli*. *Microbiology* 146 Pt 12, 3157-70.
- AONO, S., NAKAJIMA, H., SAITO, K. & OKADA, M. (1996). A novel heme protein that acts as a carbon monoxide-dependent transcriptional activator in *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem Biophys Res Commun* 228, 752-6.
- ARCE-RODRIGUEZ, A., DURANTE-RODRIGUEZ, G., PLATERO, R., KRELL, T., CALLES, B. & DE LORENZO, V. (2012). The Crp regulator of *Pseudomonas putida*: evidence of an unusually high affinity for its physiological effector, cAMP. *Environ Microbiol* 14, 702-13.
- AZAM, T. A. & ISHIHAMA, A. (1999). Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J Biol Chem* 274, 33105-13.
- BADRINARAYANAN, A., REYES-LAMOTHE, R., UPHOFF, S., LEAKE, M. C. & SHERRATT, D. J. (2012). In vivo architecture and action of bacterial structural maintenance of chromosome proteins. *Science* 338, 528-31.
- BAI, G., MCCUE, L. A. & MCDONOUGH, K. A. (2005). Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Rv3676 (CRPMt), a cyclic AMP receptor protein-like DNA binding protein. *J Bacteriol* 187, 7795-804.

- BAI, G., SCHAAK, D. D. & McDONOUGH, K. A. (2009). cAMP levels within *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG increase upon infection of macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* 55, 68-73.
- BAI, G., SCHAAK, D. D., SMITH, E. A. & McDONOUGH, K. A. (2011). Dysregulation of serine biosynthesis contributes to the growth defect of a *Mycobacterium tuberculosis* *crp* mutant. *Mol Microbiol* 82, 180-98.
- BAKEEVA, L. E., CHUMAKOV, K. M., DRACHEV, A. L., METLINA, A. L. & SKULACHEV, V. P. (1986). The sodium cycle. III. *Vibrio alginolyticus* resembles *Vibrio cholerae* and some other vibrios by flagellar motor and ribosomal 5S-RNA structures. *Biochim Biophys Acta* 850, 466-72.
- BASU, B. & APTE, S. K. (2012). Gamma radiation-induced proteome of *Deinococcus radiodurans* primarily targets DNA repair and oxidative stress alleviation. *Mol Cell Proteomics* 11, M111 011734.
- BATTISTA, J. R. (1997). Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Annu Rev Microbiol* 51, 203-24.
- BATUT, J., DAVERAN-MINGOT, M. L., DAVID, M., JACOBS, J., GARNERONE, A. M. & KAHN, D. (1989). *fixK*, a gene homologous with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. *EMBO J* 8, 1279-86.
- BEATSON, S. A., WHITCHURCH, C. B., SARGENT, J. L., LEVESQUE, R. C. & MATTICK, J. S. (2002). Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 184, 3605-13.
- BEATTY, C. M., BROWNING, D. F., BUSBY, S. J. & WOLFE, A. J. (2003). Cyclic AMP receptor protein-dependent activation of the *Escherichia coli* *acsP2* promoter by a synergistic class III mechanism. *J Bacteriol* 185, 5148-57.
- BECKER, S., HOLIGHAUS, G., GABRIELCZYK, T. & UNDEN, G. (1996). O₂ as the regulatory signal for FNR-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 178, 4515-21.
- BEN-AMOTZ, A., AND M. AVRON. (1990). *Dunaliella bardawil* can survive especially high irradiance levels by the accumulation of beta-carotene. *Trends Biotechnol* 8, 121-126.
- BENDEZU, F. O., HALE, C. A., BERNHARDT, T. G. & DE BOER, P. A. (2009). RodZ (YfgA) is required for proper assembly of the MreB actin cytoskeleton and cell shape in *E. coli*. *EMBO J* 28, 193-204.
- BENTCHIKOU, E., SERVANT, P., COSTE, G. & SOMMER, S. (2007). Additive effects of SbcCD and PolX deficiencies in the in vivo repair of DNA double-strand breaks in *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 189, 4784-90.
- BENTCHIKOU, E., SERVANT, P., COSTE, G. & 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.
- BERTIN, D. M. (1983). [1982 report of UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation)]. *J Radiol* 64, 515-9.
- BESSMAN, M. J., FRICK, D. N. & O'HANDLEY, S. F. (1996). The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes. *J Biol Chem* 271, 25059-62.
- BETTENBROCK, K., SAUTER, T., JAHREIS, K., KREMLING, A., LENGELER, J. W. & GILLES, E. D. (2007). Correlation between growth rates, EIICrr phosphorylation, and intracellular cyclic AMP levels in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 189, 6891-900.
- BHATTACHARYYA, G. & GROVE, A. (2007). The N-terminal extensions of *Deinococcus radiodurans* Dps-1 mediate DNA major groove interactions as well as assembly of the dodecamer. *J Biol Chem* 282, 11921-30.

- BLANCHARD, L., GUERIN, P., ROCHE, D., CRUVEILLER, S., PIGNOL, D., VALLENET, D., ARMENGAUD, J. & DE GROOT, A. (2017). Conservation and diversity of the IrrE/DdrO-controlled radiation response in radiation-resistant *Deinococcus* bacteria. *Microbiologyopen* 6.
- BLASIUS, M., SHEVELEV, I., JOLIVET, E., SOMMER, S. & HUBSCHER, U. (2006). DNA polymerase X from *Deinococcus radiodurans* possesses a structure-modulated 3'→5' exonuclease activity involved in radioresistance. *Mol Microbiol* 60, 165-76.
- BLATTNER, F. R., PLUNKETT, G., 3RD, BLOCH, C. A., PERNA, N. T., BURLAND, V., RILEY, M., COLLADO-VIDES, J., GLASNER, J. D., RODE, C. K., MAYHEW, G. F., GREGOR, J., DAVIS, N. W., KIRKPATRICK, H. A., GOEDEN, M. A., ROSE, D. J., MAU, B. & SHAO, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453-62.
- BLOKESCH, M. (2012). Chitin colonization, chitin degradation and chitin-induced natural competence of *Vibrio cholerae* are subject to catabolite repression. *Environ Microbiol* 14, 1898-912.
- BONACOSSA DE ALMEIDA, C., COSTE, G., SOMMER, S. & 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.
- BOTSFORD, J. L. & HARMAN, J. G. (1992). Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev* 56, 100-22.
- BOUTHIER DE LA TOUR, C., BOISNARD, S., NORAIS, C., TOUEILLE, M., BENTCHIKOU, E., VANNIER, F., COX, M. M., SOMMER, S. & 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, 1223-31.
- BOUTHIER DE LA TOUR, C., MATHIEU, M., MEYER, L., DUPAIGNE, P., PASSOT, F., SERVANT, P., SOMMER, S., LE CAM, E. & CONFALONIERI, F. (2017). In vivo and in vitro characterization of DdrC, a DNA damage response protein in *Deinococcus radiodurans* bacterium. *PLoS One* 12, e0177751.
- BOUTHIER DE LA TOUR, C., TOUEILLE, M., JOLIVET, E., NGUYEN, H. H., SERVANT, P., VANNIER, F. & SOMMER, S. (2009). The *Deinococcus radiodurans* SMC protein is dispensable for cell viability yet plays a role in DNA folding. *Extremophiles* 13, 827-37.
- BRISSETT, N. C. & DOHERTY, A. J. (2009). Repairing DNA double-strand breaks by the prokaryotic non-homologous end-joining pathway. *Biochem Soc Trans* 37, 539-45.
- BRITTON, R. A. & GROSSMAN, A. D. (1999). Synthetic lethal phenotypes caused by mutations affecting chromosome partitioning in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 181, 5860-4.
- BRITTON, R. A., LIN, D. C. & GROSSMAN, A. D. (1998). Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning. *Genes Dev* 12, 1254-9.
- BROOKS, B. R. M. (1981). Nomenclature for "*Micrococcus radiodurans*" and other radiation-resistant cocci: *Deinococcaceae* fam. nov. *Deinococcus* gen. nov., including five species. *Int J syst Bacteriol* 31, 353-360.
- BUGREEV, D. V. & NEVINSKY, G. A. (2009). Structure and mechanism of action of type IA DNA topoisomerases. *Biochemistry (Mosc)* 74, 1467-81.
- BUSBY, S. & EBRIGHT, R. H. (1999). Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* 293, 199-213.
- BUTALA, M., ZGUR-BERTOK, D. & BUSBY, S. J. (2009). The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cell Mol Life Sci* 66, 82-93.
- CALLEGAN, R. P., NOBRE, M. F., MCTERNAN, P. M., BATTISTA, J. R., NAVARRO-GONZALEZ, R., MCKAY, C. P., DA COSTA, M. S. & RAINEY, F. A. (2008). Description of four novel

- psychrophilic, ionizing radiation-sensitive *Deinococcus* species from alpine environments. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 1252-8.
- CHABA, R., GRIGOROVA, I. L., FLYNN, J. M., BAKER, T. A. & GROSS, C. A. (2007). Design principles of the proteolytic cascade governing the sigmaE-mediated envelope stress response in *Escherichia coli*: keys to graded, buffered, and rapid signal transduction. *Genes Dev* 21, 124-36.
- CHAKRABORTI, P. K., MATANGE, N., NANDICOORI, V. K., SINGH, Y., TYAGI, J. S. & VISWESWARIAH, S. S. (2011). Signalling mechanisms in *Mycobacteria*. *Tuberculosis (Edinb)* 91, 432-40.
- CHALKER, A. F., LEACH, D. R. & LLOYD, R. G. (1988). *Escherichia coli* sbcC mutants permit stable propagation of DNA replicons containing a long palindrome. *Gene* 71, 201-5.
- CHAMPOUX, J. J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 70, 369-413.
- CHANDLER, M. S. (1992). The gene encoding cAMP receptor protein is required for competence development in *Haemophilus influenzae* Rd. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1626-30.
- CHARAKA, V. K. & MISRA, H. S. (2012). Functional characterization of the role of the chromosome I partitioning system in genome segregation in *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 194, 5739-48.
- CHEN, C. H., LIN, N. T., HSIAO, Y. M., YANG, C. Y. & TSENG, Y. H. (2010a). Two non-consensus Clp binding sites are involved in upregulation of the gum operon involved in xanthan polysaccharide synthesis in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Res Microbiol* 161, 583-9.
- CHEN, H., WU, R., XU, G., FANG, X., QIU, X., GUO, H., TIAN, B. & HUA, Y. (2010b). DR2539 is a novel DtxR-like regulator of Mn/Fe ion homeostasis and antioxidant enzyme in *Deinococcus radiodurans*. *Biochem Biophys Res Commun* 396, 413-8.
- CHEN, H., XU, G., ZHAO, Y., TIAN, B., LU, H., YU, X., XU, Z., YING, N., HU, S. & HUA, Y. (2008). A novel OxyR sensor and regulator of hydrogen peroxide stress with one cysteine residue in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS One* 3, e1602.
- CHEUNG H.-Y., L. V., M. R. WITHINGTON BROWN. (1982). Toxic Effect of Manganese on Growth and Sporulation of *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of general microbiology* 128(10), 2395-2402.
- CHIN, K. H., LEE, Y. C., TU, Z. L., CHEN, C. H., TSENG, Y. H., YANG, J. M., RYAN, R. P., MCCARTHY, Y., DOW, J. M., WANG, A. H. & CHOU, S. H. (2010). The cAMP receptor-like protein CLP is a novel c-di-GMP receptor linking cell-cell signaling to virulence gene expression in *Xanthomonas campestris*. *J Mol Biol* 396, 646-62.
- CHO, K., CHO, D., WANG, G. & SALYERS, A. (2001). New regulatory gene that contributes to control of *Bacteroides thetaiotaomicron* starch utilization genes. *J Bacteriol* 183, 7198-205.
- CHOU, F. I., TAN S. T. (1991). Salt-mediated multicell formation in *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 173, 3184-90.
- CHOU, S. H. (2011). Delicate conformational changes of a protein in the CRP family lead to dramatic functional changes via binding of an alternate secondary messenger molecule. *Virulence* 2, 152-7.
- CONFALONIERI, F. S. S. (2011). Bacterial and archaeal resistance to ionizing radiation. *J. Phys.*
- CONNELLY, J. C., DE LEAU, E. S. & LEACH, D. R. (1999). DNA cleavage and degradation by the SbcCD protein complex from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 27, 1039-46.
- CONNELLY, J. C., KIRKHAM, L. A. & LEACH, D. R. (1998). The SbcCD nuclease of *Escherichia coli* is a structural maintenance of chromosomes (SMC) family protein that cleaves hairpin DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7969-74.

- CONNELLY, J. C. & LEACH, D. R. (1996). The *sbcC* and *sbcD* genes of *Escherichia coli* encode a nuclease involved in palindrome inviability and genetic recombination. *Genes Cells* 1, 285-91.
- COOPER, T. F., REMOLD, S. K., LENSKI, R. E. & SCHNEIDER, D. (2008). Expression profiles reveal parallel evolution of epistatic interactions involving the CRP regulon in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 4, e35.
- COURCELLE, J., KHODURSKY, A., PETER, B., BROWN, P. O. & HANAWALT, P. C. (2001). Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* 158, 41-64.
- COX, M. M. & BATTISTA, J. R. (2005). *Deinococcus radiodurans* - the consummate survivor. *Nat Rev Microbiol* 3, 882-92.
- CRISONA, N. J., STRICK, T. R., BENSIMON, D., CROQUETTE, V. & COZZARELLI, N. R. (2000). Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by *E. coli* topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements. *Genes Dev* 14, 2881-92.
- DAHMANE, N., GADELLE, D., DELMAS, S., CRISCUOLO, A., EBERHARD, S., DESNOUES, N., COLLIN, S., ZHANG, H., POMMIER, Y., FORTERRE, P. & SEZONOV, G. (2016). *topoIb*, a phylogenetic hallmark gene of Thaumarchaeota encodes a functional eukaryote-like topoisomerase IB. *Nucleic Acids Res* 44, 2795-805.
- DALY, M. J. (2009). A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. *Nat Rev Microbiol* 7, 237-45.
- DALY, M. J. (2012). Death by protein damage in irradiated cells. *DNA Repair (Amst)* 11, 12-21.
- DALY, M. J., GAIDAMAKOVA, E. K., MATROSOVA, V. Y., KIANG, J. G., FUKUMOTO, R., LEE, D. Y., WEHR, N. B., VITERI, G. A., BERLETT, B. S. & LEVINE, R. L. (2010). Small-molecule antioxidant proteome-shields in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS One* 5, e12570.
- DALY, M. J., GAIDAMAKOVA, E. K., MATROSOVA, V. Y., VASILENKO, A., ZHAI, M., LEAPMAN, R. D., LAI, B., RAVEL, B., LI, S. M., KEMNER, K. M. & FREDRICKSON, J. K. (2007). Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. *PLoS Biol* 5, e92.
- DALY, M. J., GAIDAMAKOVA, E. K., MATROSOVA, V. Y., VASILENKO, A., ZHAI, M., VENKATESWARAN, A., HESS, M., OMELCHENKO, M. V., KOSTANDARITHES, H. M., MAKAROVA, K. S., WACKETT, L. P., FREDRICKSON, J. K. & GHOSAL, D. (2004). Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. *Science* 306, 1025-8.
- DALY, M. J. & 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, 4461-71.
- DANILOVA, O., REYES-LAMOTHE, R., PINSKAYA, M., SHERRATT, D. & POSSOZ, C. (2007). *MukB* colocalizes with the *oriC* region and is required for organization of the two *Escherichia coli* chromosome arms into separate cell halves. *Mol Microbiol* 65, 1485-92.
- DARMON, E., NOONE, D., MASSON, A., BRON, S., KUIPERS, O. P., DEVINE, K. M. & VAN DIJL, J. M. (2002). A novel class of heat and secretion stress-responsive genes is controlled by the autoregulated C_{ss}RS two-component system of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 184, 5661-71.
- DE GROOT, A., CHAPON, V., SERVANT, P., CHRISTEN, R., SAUX, M. F., SOMMER, S. & HEULIN, T. (2005). *Deinococcus deserti* sp. nov., a gamma-radiation-tolerant bacterium isolated from the Sahara Desert. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2441-6.

- DE GROOT, A., DULERMO, R., ORTET, P., BLANCHARD, L., GUERIN, P., FERNANDEZ, B., VACHERIE, B., DOSSAT, C., JOLIVET, E., SIGUIER, P., CHANDLER, M., BARAKAT, M., DEDIEU, A., BARBE, V., HEULIN, T., SOMMER, S., ACHOUAK, W. & ARMENGAUD, J. (2009). Alliance of proteomics and genomics to unravel the specificities of Sahara bacterium *Deinococcus deserti*. *PLoS Genet* 5, e1000434.
- DE LA TOUR, C. B., PASSOT, F. M., TOUEILLE, M., MIRABELLA, B., GUERIN, P., BLANCHARD, L., SERVANT, P., DE GROOT, A., SOMMER, S. & ARMENGAUD, J. (2013). Comparative proteomics reveals key proteins recruited at the nucleoid of *Deinococcus* after irradiation-induced DNA damage. *Proteomics* 13, 3457-69.
- DEROUAUX, A., HALICI, S., NOTHAFT, H., NEUTELINGS, T., MOUTZOURELIS, G., DUSART, J., TITGEMEYER, F. & RIGALI, S. (2004). Deletion of a cyclic AMP receptor protein homologue diminishes germination and affects morphological development of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 186, 1893-7.
- DERRE, I., RAPOPORT, G. & MSADEK, T. (2000). The CtsR regulator of stress response is active as a dimer and specifically degraded in vivo at 37 degrees C. *Mol Microbiol* 38, 335-47.
- DESAL, S. S., RAJPUROHIT, Y. S., MISRA, H. S. & DEOBAGKAR, D. N. (2011). Characterization of the role of the RadS/RadR two-component system in the radiation resistance of *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology* 157, 2974-82.
- DEUERLING, E., SCHULZE-SPECKING, A., TOMOYASU, T., MOGK, A. & BUKAU, B. (1999). Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature* 400, 693-6.
- DEUTSCHER, J. (2008). The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 11, 87-93.
- DEVIGNE, A., GUERIN, P., LISBOA, J., QUEVILLON-CHERUEL, S., ARMENGAUD, J., SOMMER, S., BOUTHIER DE LA TOUR, C. & SERVANT, P. (2016). PprA Protein Is Involved in Chromosome Segregation via Its Physical and Functional Interaction with DNA Gyrase in Irradiated *Deinococcus radiodurans* Bacteria. *mSphere* 1.
- DEVIGNE, A., ITHURBIDE, S., BOUTHIER DE LA TOUR, C., PASSOT, F., MATHIEU, M., SOMMER, S. & 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, 1069-84.
- DEVIGNE, A., MERSAOUI, S., BOUTHIER-DE-LA-TOUR, C., SOMMER, S. & SERVANT, P. (2013). The PprA protein is required for accurate cell division of gamma-irradiated *Deinococcus radiodurans* bacteria. *DNA Repair (Amst)* 12, 265-72.
- DIGATE, R. J. & MARIANS, K. J. (1989). Molecular cloning and DNA sequence analysis of *Escherichia coli* topB, the gene encoding topoisomerase III. *J Biol Chem* 264, 17924-30.
- DILLINGHAM, M. S. & KOWALCZYKOWSKI, S. C. (2008). RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks. *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 642-71, Table of Contents.
- DIRUGGIERO, J., SANTANGELO, N., NACKERDIEN, Z., RAVEL, J. & ROBB, F. T. (1997). Repair of extensive ionizing-radiation DNA damage at 95 degrees C in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol* 179, 4643-5.
- DOSE, K., BIEGER-DOSE, A., LABUSCH M., GILL M. (1992). Survival in extreme dryness and DNA-single-strand breaks. *Adv Space Rev* 12, 221-9.
- DRLICA, K. & ROUVIERE-YANIV, J. (1987). Histonelike proteins of bacteria. *Microbiol Rev* 51, 301-19.
- DRLICA, K. & ZHAO, X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 377-92.

- DROLET, M., BROCCOLI, S., RALLU, F., HRAIKY, C., FORTIN, C., MASSE, E. & BAAKLINI, I. (2003). The problem of hypernegative supercoiling and R-loop formation in transcription. *Front Biosci* 8, 210-21.
- DU, X. & TAKAGI, H. (2007). N-Acetyltransferase Mpr1 confers ethanol tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen species. *Appl Microbiol Biotechnol* 75, 1343-51.
- DUFOUR, A. & HALDENWANG, W. G. (1994). Interactions between a *Bacillus subtilis* anti-sigma factor (RsbW) and its antagonist (RsbV). *J Bacteriol* 176, 1813-20.
- DULERMO, R., ONODERA, T., COSTE, G., PASSOT, F., DUTERTRE, M., PORTERON, M., CONFALONIERI, F., SOMMER, S. & PASTERNAK, C. (2015). Identification of new genes contributing to the extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans* using a Tn5-based transposon mutant library. *PLoS One* 10, e0124358.
- DUTTA, T. & SRIVASTAVA, S. (2018). Small RNA-mediated regulation in bacteria: A growing palette of diverse mechanisms. *Gene* 656, 60-72.
- EARL, A. M., MOHUNDRO, M. M., MIAN, I. S. & BATTISTA, J. R. (2002a). The IrrE protein of *Deinococcus radiodurans* R1 is a novel regulator of recA expression. *J Bacteriol* 184, 6216-24.
- EARL, A. M., RANKIN, S. K., KIM, K. P., LAMENDOLA, O. N. & BATTISTA, J. R. (2002b). Genetic evidence that the *uvrE* gene product of *Deinococcus radiodurans* R1 is a UV damage endonuclease. *J Bacteriol* 184, 1003-9.
- ELSHOLZ, A. K., HEMPEL, K., POTTER, D. C., BECHER, D., HECKER, M. & GERTH, U. (2011). CtsR inactivation during thiol-specific stress in low GC, Gram+ bacteria. *Mol Microbiol* 79, 772-85.
- ESPELI, O., LEE, C. & MARIANS, K. J. (2003). A physical and functional interaction between *Escherichia coli* FtsK and topoisomerase IV. *J Biol Chem* 278, 44639-44.
- ESPELI, O. & MARIANS, K. J. (2004). Untangling intracellular DNA topology. *Mol Microbiol* 52, 925-31.
- FADDA, D., SANTONA, A., D'ULISSE, V., GHELARDINI, P., ENNAS, M. G., WHALEN, M. B. & MASSIDDA, O. (2007). *Streptococcus pneumoniae* DivIVA: localization and interactions in a MinCD-free context. *J Bacteriol* 189, 1288-98.
- FENNELL-FEZZIE, R., GRADIA, S. D., AKEY, D. & BERGER, J. M. (2005). The MukF subunit of *Escherichia coli* condensin: architecture and functional relationship to kleisins. *EMBO J* 24, 1921-30.
- FERREIRA, A. C., NOBRE, M. F., RAINEY, F. A., SILVA, M. T., WAIT, R., BURGHARDT, J., CHUNG, A. P. & DA COSTA, M. S. (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, 939-47.
- FINCH, P. W., CHAMBERS, P. & EMMERSON, P. T. (1985). Identification of the *Escherichia coli* recN gene product as a major SOS protein. *J Bacteriol* 164, 653-8.
- FISCHER, H. M. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev* 58, 352-86.
- FOGEL, M. A. & WALDOR, M. K. (2006). A dynamic, mitotic-like mechanism for bacterial chromosome segregation. *Genes Dev* 20, 3269-82.
- FONG, J. C. & YILDIZ, F. H. (2008). Interplay between cyclic AMP-cyclic AMP receptor protein and cyclic di-GMP signaling in *Vibrio cholerae* biofilm formation. *J Bacteriol* 190, 6646-59.
- FRENKIEL-KRISPIN, D., BEN-AVRAHAM, I., ENGLANDER, J., SHIMONI, E., WOLF, S. G. & MINSKY, A. (2004). Nucleoid restructuring in stationary-state bacteria. *Mol Microbiol* 51, 395-405.

- FUCHS, E. L., BRUTINEL, E. D., JONES, A. K., FULCHER, N. B., URBANOWSKI, M. L., YAHR, T. L. & WOLFGANG, M. C. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* Vfr regulator controls global virulence factor expression through cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms. *J Bacteriol* 192, 3553-64.
- FUHRMANN, J., SCHMIDT, A., SPIESS, S., LEHNER, A., TURGAY, K., MECHTLER, K., CHARPENTIER, E. & CLAUSEN, T. (2009). McsB is a protein arginine kinase that phosphorylates and inhibits the heat-shock regulator CtsR. *Science* 324, 1323-7.
- FUNAYAMA, T., NARUMI, I., KIKUCHI, M., KITAYAMA, S., WATANABE, H. & YAMAMOTO, K. (1999). Identification and disruption analysis of the *recN* gene in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mutat Res* 435, 151-61.
- GALLAGHER, D. T., SMITH, N., KIM, S. K., ROBINSON, H. & REDDY, P. T. (2009). Profound asymmetry in the structure of the cAMP-free cAMP Receptor Protein (CRP) from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 284, 8228-32.
- GANCEDO, J. M. (2013). Biological roles of cAMP: variations on a theme in the different kingdoms of life. *Biol Rev Camb Philos Soc* 88, 645-68.
- GAO, C., HINDRA, MULDER, D., YIN, C. & ELLIOT, M. A. (2012). Crp is a global regulator of antibiotic production in streptomycetes. *MBio* 3.
- GAO, G., LE, D., HUANG, L., LU, H., NARUMI, I. & HUA, Y. (2006). Internal promoter characterization and expression of the *Deinococcus radiodurans* *pprI-folP* gene cluster. *FEMS Microbiol Lett* 257, 195-201.
- GELLERT, M., MENZEL, R., MIZUUCHI, K., O'DEA, M.H. & FRIEDMAN, D.I. (1983). Regulation of DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harb Symp Quant Bio* 47 Pt 2, 763-7.
- GELLERT, M., MIZUUCHI, K., O'DEA, M. H. & NASH, H. A. (1976). DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 3872-6.
- GENG, H. & JIANG, R. (2015). cAMP receptor protein (CRP)-mediated resistance/tolerance in bacteria: mechanism and utilization in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 4533-43.
- GERARD, E., JOLIVET, E., PRIEUR, D. & FORTERRE, P. (2001). DNA protection mechanisms are not involved in the radioresistance of the hyperthermophilic archaea *Pyrococcus abyssi* and *P. furiosus*. *Mol Genet Genomics* 266, 72-8.
- GHOSAL, D., OMELCHENKO, M. V., GAIDAMAKOVA, E. K., MATROSOVA, V. Y., VASILENKO, A., VENKATESWARAN, A., ZHAI, M., KOSTANDARITHES, H. M., BRIM, H., MAKAROVA, K. S., WACKETT, L. P., FREDRICKSON, J. K. & DALY, M. J. (2005). How radiation kills cells: survival of *Deinococcus radiodurans* and *Shewanella oneidensis* under oxidative stress. *FEMS Microbiol Rev* 29, 361-75.
- GIROTTI, A. W. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 39, 1529-42.
- GLADYSHEV, E. & MESELSON, M. (2008). Extreme resistance of bdelloid rotifers to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5139-44.
- GLASFELD, A., GUEDON, E., HELMANN, J. D. & BRENNAN, R. G. (2003). Structure of the manganese-bound manganese transport regulator of *Bacillus subtilis*. *Nat Struct Biol* 10, 652-7.
- GONG, C., BONGIORNO, P., MARTINS, A., STEPHANOU, N. C., ZHU, H., SHUMAN, S. & GLICKMAN, M. S. (2005). Mechanism of nonhomologous end-joining in mycobacteria: a low-fidelity repair system driven by Ku, ligase D and ligase C. *Nat Struct Mol Biol* 12, 304-12.
- GOSSET, G., ZHANG, Z., NAYYAR, S., CUEVAS, W. A. & SAIER, M. H., JR. (2004). Transcriptome analysis of Crp-dependent catabolite control of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186, 3516-24.

- GOSTICK, D. O., GREEN, J., IRVINE, A. S., GASSON, M. J. & GUEST, J. R. (1998). A novel regulatory switch mediated by the FNR-like protein of *Lactobacillus casei*. *Microbiology* 144 (Pt 3), 705-17.
- GOSTICK, D. O., GRIFFIN, H. G., SHEARMAN, C. A., SCOTT, C., GREEN, J., GASSON, M. J. & GUEST, J. R. (1999). Two operons that encode FNR-like proteins in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* 31, 1523-35.
- GOTTESMAN, S. & STORZ, G. (2011). Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- GRAINGER, D. C., HURD, D., HARRISON, M., HOLDSTOCK, J. & BUSBY, S. J. (2005). Studies of the distribution of *Escherichia coli* cAMP-receptor protein and RNA polymerase along the *E. coli* chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17693-8.
- GRAUMANN, P. L. (2000). *Bacillus subtilis* SMC is required for proper arrangement of the chromosome and for efficient segregation of replication termini but not for bipolar movement of newly duplicated origin regions. *J Bacteriol* 182, 6463-71.
- GRAUMANN, P. L. & KNUST, T. (2009). Dynamics of the bacterial SMC complex and SMC-like proteins involved in DNA repair. *Chromosome Res* 17, 265-75.
- GRAUMANN, P. L., LOSICK, R. & STRUNNIKOV, A. V. (1998). Subcellular localization of *Bacillus subtilis* SMC, a protein involved in chromosome condensation and segregation. *J Bacteriol* 180, 5749-55.
- GRAUMANN, P. L. & MARAHIEL, M. A. (1998). A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends Biochem Sci* 23, 286-90.
- GREEN, J., STAPLETON, M. R., SMITH, L. J., ARTYMIUK, P. J., KAHRAMANOGLOU, C., HUNT, D. M. & BUXTON, R. S. (2014). Cyclic-AMP and bacterial cyclic-AMP receptor proteins revisited: adaptation for different ecological niches. *Curr Opin Microbiol* 18, 1-7.
- GREEN, P. N., AND I. J. BOUSFIELD. (1983). Emendation of *Methylobacterium* Patt, Cole, and Hanson 1976; *Methylobacterium rhodium* (Heumann 1962) comb. nov. corrig.; *Methylobacterium radiotolerans* (Ito and Iizuka 1971) comb. nov. corrig.; and *Methylobacterium mesophilicum* (Austin and Goodfellow 1979) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33, 875-877.
- GRIFFITHS, E. & GUPTA, R. S. (2004). Distinctive protein signatures provide molecular markers and evidence for the monophyletic nature of the deinococcus-thermus phylum. *J Bacteriol* 186, 3097-107.
- GRIFFITHS, E. & GUPTA, R. S. (2007). Identification of signature proteins that are distinctive of the Deinococcus-Thermus phylum. *Int Microbiol* 10, 201-8.
- GRONENBORN, A. M., SANDULACHE, R., GARTNER, S. & CLORE, G. M. (1988). Mutations in the cyclic AMP binding site of the cyclic AMP receptor protein of *Escherichia coli*. *Biochem J* 253, 801-7.
- GRUBER, S., HAERING, C. H. & NASMYTH, K. (2003). Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell* 112, 765-77.
- GUISBERT, E., HERMAN, C., LU, C. Z. & GROSS, C. A. (2004). A chaperone network controls the heat shock response in *E. coli*. *Genes Dev* 18, 2812-21.
- GUPTA, R. S. & JOHARI, V. (1998). Signature sequences in diverse proteins provide evidence of a close evolutionary relationship between the Deinococcus-thermus group and cyanobacteria. *J Mol Evol* 46, 716-20.
- GUTMAN, P. D., CARROLL, J. D., MASTERS, C. I. & MINTON, K. W. (1994). Sequencing, targeted mutagenesis and expression of a *recA* gene required for the extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *Gene* 141, 31-7.
- HALLIWELL, B., AND J. M. GUTTERIDGE. . (1999). *Free radicals in biology and medicine*, 3rd ed. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.

- HANSEN, M. T. (1978). Multiplicity of genome equivalents in the radiation-resistant bacterium *Micrococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 134, 71-5.
- HARMAN, J. G. (2001). Allosteric regulation of the cAMP receptor protein. *Biochim Biophys Acta* 1547, 1-17.
- HARMON, F. G., DIGATE, R. J. & KOWALCZYKOWSKI, S. C. (1999). RecQ helicase and topoisomerase III comprise a novel DNA strand passage function: a conserved mechanism for control of DNA recombination. *Mol cell* 3,611-20.
- HARRIS, D. R., TANAKA, M., SAVELIEV, S. V., JOLIVET, E., EARL, A. M., COX, M. M. & BATTISTA, J. R. (2004). Preserving genome integrity: the DdrA protein of *Deinococcus radiodurans* R1. *PLoS Biol* 2, e304.
- HARSOJO, KITAYAMA, S. & MATSUYAMA, A. (1981). Genome multiplicity and radiation resistance in *Micrococcus radiodurans*. *J Biochem* 90, 877-80.
- HAVERKORN VAN RIJSEWIJK, B. R., NANCHEN, A., NALLET, S., KLEIJN, R. J. & SAUER, U. (2011). Large-scale ¹³C-flux analysis reveals distinct transcriptional control of respiratory and fermentative metabolism in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol* 7, 477.
- HAYAMA, R. & 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, 18826-31.
- HE, Y., SHELVER, D., KERBY, R. L. & ROBERTS, G. P. (1996). Characterization of a CO-responsive transcriptional activator from *Rhodospirillum rubrum*. *J Biol Chem* 271, 120-3.
- HERRERA, M. C., DADDAOUA, A., FERNANDEZ-ESCAMILLA, A. & RAMOS, J. L. (2012). Involvement of the global Crp regulator in cyclic AMP-dependent utilization of aromatic amino acids by *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 194, 406-12.
- HERRERO, A., MURO-PASTOR, A. M. & FLORES, E. (2001). Nitrogen control in cyanobacteria. *J Bacteriol* 183, 411-25.
- HIASA, H. & MARIANS, K. J. (1996). Two distinct modes of strand unlinking during theta-type DNA replication. *J Biol Chem* 271, 21529-35.
- HIPKISS, A. R. (2006). Accumulation of altered proteins and ageing: causes and effects. *Exp Gerontol* 41, 464-73.
- HIRAGA, S., NIKI, H., OGURA, T., ICHINOSE, C., MORI, H., EZAKI, B. & JAFFE, A. (1989). Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells. *J Bacteriol* 171, 1496-505.
- HIRANO, M., ANDERSON, D. E., ERICKSON, H. P. & HIRANO, T. (2001). Bimodal activation of SMC ATPase by intra- and inter-molecular interactions. *EMBO J* 20, 3238-50.
- HIRANO, M. & HIRANO, T. (2002). Hinge-mediated dimerization of SMC protein is essential for its dynamic interaction with DNA. *EMBO J* 21, 5733-44.
- HIRSCH, P., GALLIKOWSKI, C. A., SIEBERT, J., PEISSL, K., KROPPESTEDT, R., SCHUMANN, P., STACKEBRANDT, E. & ANDERSON, R. (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. *Syst Appl Microbiol* 27, 636-45.
- HOEIJMAKERS, J. H. (1991). How relevant is the *Escherichia coli* UvrABC model for excision repair in eukaryotes? *J Cell Sci* 100 (Pt 4), 687-91.
- HOLLIDAY, R. (1964). The Induction of Mitotic Recombination by Mitomycin C in *Ustilago* and *Saccharomyces*. *Genetics* 50, 323-35.
- HOPFNER, K. P., CRAIG, L., MONCALIAN, G., ZINKEL, R. A., USUI, T., OWEN, B. A., KARCHER, A., HENDERSON, B., BODMER, J. L., MCMURRAY, C. T., CARNEY, J. P., PETRINI, J. H. & TAINER, J. A. (2002). The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* 418, 562-6.

- HOPFNER, K. P., KARCHER, A., CRAIG, L., WOO, T. T., CARNEY, J. P. & TAINER, J. A. (2001). Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. *Cell* 105, 473-85.
- HORII, Z. & CLARK, A. J. (1973). Genetic analysis of the recF pathway to genetic recombination in *Escherichia coli* K12: isolation and characterization of mutants. *J Mol Biol* 80, 327-44.
- HORIKAWA, D. D., IWATA, K., KAWAI, K., KOSEKI, S., OKUDA, T. & YAMAMOTO, K. (2009). High hydrostatic pressure tolerance of four different anhydrobiotic animal species. *Zool Sci* 26, 238-42.
- HSIEH, T. J., FARH, L., HUANG, W. M. & CHAN, N. L. (2004). Structure of the topoisomerase IV C-terminal domain: a broken beta-propeller implies a role as geometry facilitator in catalysis. *J Biol Chem* 279, 55587-93.
- HSIEH, T. S. & WANG, J. C. (1975). Thermodynamic properties of superhelical DNAs. *Biochemistry* 14, 527-35.
- HU, Y., TIAN, B., XU, G., YIN, L., HUA, X., LIN, J. & HUA, Y. (2010). Characteristics of nuclease activity of the SbcCD complex from *Deinococcus radiodurans*. *J Biochem* 147, 307-15.
- HUA, X. & HUA, Y. (2016). Improved Complete Genome Sequence of the Extremely Radioresistant Bacterium *Deinococcus radiodurans* R1 Obtained Using PacBio Single-Molecule Sequencing. *Genome Announc* 4.
- HUA, Y., NARUMI, I., GAO, G., TIAN, B., SATOH, K., KITAYAMA, S. & SHEN, B. (2003). PprI: a general switch responsible for extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 354-60.
- HUTCHINGS, M. I. & SPIRO, S. (2000). The nitric oxide regulated nor promoter of *Paracoccus denitrificans*. *Microbiology* 146 (Pt 10), 2635-41.
- HYRYLAINEN, H. L., BOLHUIS, A., DARMON, E., MUUKKONEN, L., KOSKI, P., VITIKAINEN, M., SARVAS, M., PRAGAI, Z., BRON, S., VAN DIJL, J. M. & KONTINEN, V. P. (2001). A novel two-component regulatory system in *Bacillus subtilis* for the survival of severe secretion stress. *Mol Microbiol* 41, 1159-72.
- IM, S., SONG, D., JOE, M., KIM, D., PARK, D. H. & LIM, S. (2012). Comparative survival analysis of 12 histidine kinase mutants of *Deinococcus radiodurans* after exposure to DNA-damaging agents. *Bioprocess Biosyst Eng* 36, 781-9.
- IMAM, S., NOGUERA, D. R. & DONOHUE, T. J. (2014). Global analysis of photosynthesis transcriptional regulatory networks. *PLoS Genet* 10, e1004837.
- IMLAY, J. A. (2006). Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol Microbiol* 59, 1073-82.
- IRETON, K., GUNTHER, N. W. T. & GROSSMAN, A. D. (1994). spo0J is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 176, 5320-9.
- JEONG, S. W., SEO, H. S., KIM, M. K., CHOI, J. I., LIM, H. M. & LIM, S. (2016). PprM is necessary for up-regulation of katE1, encoding the major catalase of *Deinococcus radiodurans*, under unstressed culture conditions. *J Microbiol* 54, 426-31.
- JOHANSSON, J., MANDIN, P., RENZONI, A., CHIARUTTINI, C., SPRINGER, M. & COSSART, P. (2002). An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 110, 551-61.
- JOLIVET, E., L'HARIDON, S., CORRE, E., FORTERRE, P. & PRIEUR, D. (2003). *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 847-51.

- JOLIVET, E., LECOINTE, F., COSTE, G., SATOH, K., NARUMI, I., BAILONE, A. & SOMMER, S. (2006). Limited concentration of RecA delays DNA double-strand break repair in *Deinococcus radiodurans* R1. *Mol Microbiol* 59, 338-49.
- JORDAN, P. A., THOMSON, A. J., RALPH, E. T., GUEST, J. R. & GREEN, J. (1997). FNR is a direct oxygen sensor having a biphasic response curve. *FEBS Lett* 416, 349-52.
- JORGE, A. M., HOICZYK, E., GOMES, J. P. & PINHO, M. G. (2011). EzrA contributes to the regulation of cell size in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 6, e27542.
- JOSEPH, N., DUPPATLA, V. & RAO, D. N. (2006). Prokaryotic DNA mismatch repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 81, 1-49.
- JOSHI, B., SCHMID, R., ALTENDORF, K. & APTE, S. K. (2004). Protein recycling is a major component of post-irradiation recovery in *Deinococcus radiodurans* strain R1. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 1112-7.
- KAIMER, C., GONZALEZ-PASTOR, J. E. & GRAUMANN, P. L. (2009). SpoIIIE and a novel type of DNA translocase, SftA, couple chromosome segregation with cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 74, 810-25.
- KAIMER, C., SCHENK, K. & GRAUMANN, P. L. (2011). Two DNA translocases synergistically affect chromosome dimer resolution in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 193, 1334-40.
- KAMBLE, V. A., RAJPUROHIT, Y. S., SRIVASTAVA, A. K. & MISRA, H. S. (2010). Increased synthesis of signaling molecules coincides with reversible inhibition of nucleolytic activity during postirradiation recovery of *Deinococcus radiodurans*. *FEMS Microbiol Lett* 303, 18-25.
- KANTAKE, N., MADIRAJU, M. V., SUGIYAMA, T. & KOWALCZYKOWSKI, S. C. (2002). *Escherichia coli* RecO protein anneals ssDNA complexed with its cognate ssDNA-binding protein: A common step in genetic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15327-32.
- KEYAMURA, K., SAKAGUCHI, C., KUBOTA, Y., NIKI, H. & HISHIDA, T. (2013). RecA protein recruits structural maintenance of chromosomes (SMC)-like RecN protein to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 288, 29229-37.
- KHODURSKY, A. B., PETER, B. J., SCHMID, M.B., DERISI, J., BOTSTEIN, D., BROWN, P. O. & COZZARELLI, N.R. (2000). Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 9419-24.
- KIDANE, D., SANCHEZ, H., ALONSO, J. C. & GRAUMANN, P. L. (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. *Mol Microbiol* 52, 1627-39.
- KILEY, P. J. & BEINERT, H. (1998). Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *FEMS Microbiol Rev* 22, 341-52.
- KILEY, P. J. & REZNIKOFF, W. S. (1991). Fnr mutants that activate gene expression in the presence of oxygen. *J Bacteriol* 173, 16-22.
- KIM, H. J., KIM, T. H., KIM, Y. & LEE, H. S. (2004a). Identification and characterization of glxR, a gene involved in regulation of glyoxylate bypass in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* 186, 3453-60.
- KIM, J., YOSHIMURA, S. H., HIZUME, K., OHNIWA, R. L., ISHIHAMA, A. & TAKEYASU, K. (2004b). Fundamental structural units of the *Escherichia coli* nucleoid revealed by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res* 32, 1982-92.
- KIRKEGAARD, K. & WANG, J. C. (1985). Bacterial DNA topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single-stranded loop. *J Mol Biol* 185, 625-37.
- KIRSTEIN, J., DOUGAN, D. A., GERTH, U., HECKER, M. & TURGAY, K. (2007). The tyrosine kinase McsB is a regulated adaptor protein for ClpCP. *EMBO J* 26, 2061-70.

- KIRSTEIN, J., ZUHLKE, D., GERTH, U., TURGAY, K. & HECKER, M. (2005). A tyrosine kinase and its activator control the activity of the CtsR heat shock repressor in *B. subtilis*. *EMBO J* 24, 3435-45.
- KISKER, C., KUPER, J. & VAN HOUTEN, B. (2013). Prokaryotic nucleotide excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a012591.
- KITAYAMA, S. (1982). Adaptive repair of cross-links in DNA of *Micrococcus radiodurans*. *Biochim Biophys Acta* 697, 381-4.
- KITAYAMA, S., KOHOROKU, M., TAKAGI, A. & ITOH, H. (1997). Mutation of *D. radiodurans* in a gene homologous to *ruvB* of *E. coli*. *Mutat Res* 385, 151-7.
- KLEEREBEZEM, M., CRIELAARD, W. & TOMMASSEN, J. (1996). Involvement of stress protein PspA (phage shock protein A) of *Escherichia coli* in maintenance of the protonmotive force under stress conditions. *EMBO J* 15, 162-71.
- KOBATAKE, M., TANABE, S. & HASEGAWA, S. (1973). [New *Micrococcus* radioresistant red pigment, isolated from *Lama glama* feces, and its use as microbiological indicator of radiosterilization]. *C R Seances Soc Biol Fil* 167, 1506-10.
- KOHL, T. A., BAUMBACH, J., JUNGWIRTH, B., PUHLER, A. & TAUCH, A. (2008). The GlxR regulon of the amino acid producer *Corynebacterium glutamicum*: in silico and in vitro detection of DNA binding sites of a global transcription regulator. *J Biotechnol* 135, 340-50.
- KOHL, T. A. & TAUCH, A. (2009). The GlxR regulon of the amino acid producer *Corynebacterium glutamicum*: Detection of the corynebacterial core regulon and integration into the transcriptional regulatory network model. *J Biotechnol* 143, 239-46.
- KOLB, A., IGARASHI, K., ISHIHAMA, A., LAVIGNE, M., BUCKLE, M. & BUC, H. (1993). *E. coli* RNA polymerase, deleted in the C-terminal part of its alpha-subunit, interacts differently with the cAMP-CRP complex at the *lacP1* and at the *galP1* promoter. *Nucleic Acids Res* 21, 319-26.
- KORNER, H., SOFIA, H. J. & ZUMFT, W. G. (2003). Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev* 27, 559-92.
- KOTA, S., CHARAKA, V. K. & MISRA, H. S. (2014a). PprA, a pleiotropic protein for radioresistance, works through DNA gyrase and shows cellular dynamics during postirradiation recovery in *Deinococcus radiodurans*. *J Genet* 93, 349-54.
- KOTA, S., CHARAKA, V. K., RINGGAARD, S., WALDOR, M. K. & MISRA, H. S. (2014b). PprA contributes to *Deinococcus radiodurans* resistance to nalidixic acid, genome maintenance after DNA damage and interacts with deinococcal topoisomerases. *PLoS One* 9, e85288.
- KOWALCZYKOWSKI, S. C. (2000). Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem Sci* 25, 156-65.
- 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.
- KRISKO, A. & RADMAN, M. (2010). Protein damage and death by radiation in *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14373-7.
- KROGH, B. O. & SHUMAN, S. (2002). A poxvirus-like type IB topoisomerase family in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1853-8.
- KROL, E., KLANER, C., GNAU, P., KAEVER, V., ESSEN, L. O. & BECKER, A. (2016). Cyclic mononucleotide- and Clr-dependent gene regulation in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology* 162, 1840-1856.

- KRUGER, N. J. & STINGL, K. (2011). Two steps away from novelty--principles of bacterial DNA uptake. *Mol Microbiol* 80, 860-7.
- KUMAR, P., JOSHI, D. C., AKIF, M., AKHTER, Y., HASNAIN, S. E. & MANDE, S. C. (2010). Mapping conformational transitions in cyclic AMP receptor protein: crystal structure and normal-mode analysis of *Mycobacterium tuberculosis* apo-cAMP receptor protein. *Biophys J* 98, 305-14.
- KWIATKOWSKI, A. V. & SHAPLEIGH, J. P. (1996). Requirement of nitric oxide for induction of genes whose products are involved in nitric oxide metabolism in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *J Biol Chem* 271, 24382-8.
- LAMMENS, A., SCHELE, A. & HOPFNER, K. P. (2004). Structural biochemistry of ATP-driven dimerization and DNA-stimulated activation of SMC ATPases. *Curr Biol* 14, 1778-82.
- LAWSON, C. L., SWIGON, D., MURAKAMI, K. S., DARST, S. A., BERMAN, H. M. & EBRIGHT, R. H. (2004). Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr Opin Struct Biol* 14, 10-20.
- LAZAZZERA, B. A., BEINERT, H., KHOROSHILOVA, N., KENNEDY, M. C. & KILEY, P. J. (1996). DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. *J Biol Chem* 271, 2762-8.
- LEACH, D. R., OKELY, E. A. & PINDER, D. J. (1997). Repair by recombination of DNA containing a palindromic sequence. *Mol Microbiol* 26, 597-606.
- LEACH, D. R. & STAHL, F. W. (1983). Viability of lambda phages carrying a perfect palindrome in the absence of recombination nucleases. *Nature* 305, 448-51.
- LEAPER, S., RESNICK, M. A. & HOLLIDAY, R. (1980). Repair of double-strand breaks and lethal damage in DNA of *Ustilago maydis*. *Genet Res* 35, 291-307.
- LECOINTE, F., COSTE, G., SOMMER, S. & BAILONE, A. (2004). Vectors for regulated gene expression in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Gene* 336, 25-35.
- LEE, C., LEE, S. M., MUKHOPADHYAY, P., KIM, S. J., LEE, S. C., AHN, W. S., YU, M. H., STORZ, G. & RYU, S. E. (2004). Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1179-85.
- LEE, E. J., GLASGOW, J., LEU, S. F., BELDUZ, A. O. & HARMAN, J. G. (1994). Mutagenesis of the cyclic AMP receptor protein of *Escherichia coli*: targeting positions 83, 127 and 128 of the cyclic nucleotide binding pocket. *Nucleic Acids Res* 22, 2894-901.
- LEE, P. S. & GROSSMAN, A. D. (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*. *Mol Microbiol* 60, 853-69.
- LEIBOWITZ, P. J., SCHWARTZBERG, L. S. & BRUCE, A. K. (1976). The in vivo association of manganese with the chromosome of *Micrococcus radiodurans*. *Photochem Photobiol* 23, 45-50.
- LEMEE, L., E. PEUCHANT, M. CLERC, M. BRUNNER, AND H. PFANDER. . (1997). Deinoxanthin: a new carotenoid isolated from *Deinococcus radiodurans*. *Tetrahedron* 53, 919-926.
- LEVIN-ZAIDMAN, S., ENGLANDER, J., SHIMONI, E., SHARMA, A. K., MINTON, K. W. & MINSKY, A. (2003). Ringlike structure of the *Deinococcus radiodurans* genome: a key to radioresistance? *Science* 299, 254-6.
- LI, J. & LEE, J. C. (2011). Modulation of allosteric behavior through adjustment of the differential stability of the two interacting domains in *E. coli* cAMP receptor protein. *Biophys Chem* 159, 210-6.

- LI, W., MA, Y., YANG, J., XIAO, F., WANG, W. & HE, S. (2017). RNA-Binding Domain is Necessary for PprM Function in Response to the Extreme Environmental Stress in *Deinococcus radiodurans*. *Indian J Microbiol* 57, 492-498.
- LIANG, W., PASCUAL-MONTANO, A., SILVA, A. J. & BENITEZ, J. A. (2007). The cyclic AMP receptor protein modulates quorum sensing, motility and multiple genes that affect intestinal colonization in *Vibrio cholerae*. *Microbiology* 153, 2964-75.
- LIN, D. C. & GROSSMAN, A. D. (1998). Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site. *Cell* 92, 675-85.
- LINDOW, J. C., BRITTON, R. A. & GROSSMAN, A. D. (2002). Structural maintenance of chromosomes protein of *Bacillus subtilis* affects supercoiling in vivo. *J Bacteriol* 184, 5317-22.
- LIPSCOMB, G. L., KEESE, A. M., COWART, D. M., SCHUT, G. J., THOMM, M., ADAMS, M. W. & SCOTT, R. A. (2009). SurR: a transcriptional activator and repressor controlling hydrogen and elemental sulphur metabolism in *Pyrococcus furiosus*. *Mol Microbiol* 71, 332-49.
- LITTLE, J. W. & MOUNT, D. W. (1982). The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* 29, 11-22.
- LIU, C., WANG, L., LI, T., LIN, L., DAI, S., TIAN, B. & HUA, Y. (2014). A PerR-like protein involved in response to oxidative stress in the extreme bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Biochem Biophys Res Commun* 450, 575-80.
- LIU, L. F. & WANG, J. C. (1987). Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7024-7.
- LIU, Y., GAO, Z. Q., SHE, Z., QU, K., WANG, W. J., SHTYKOVA, E. V., XU, J. H., JI, C. N. & DONG, Y. H. (2012). The structural basis of the response regulator DrRRA from *Deinococcus radiodurans*. *Biochem Biophys Res Commun* 417, 1206-12.
- LIU, Y., ZHOU, J., OMELCHENKO, M. V., BELIAEV, A. S., VENKATESWARAN, A., STAIR, J., WU, L., THOMPSON, D. K., XU, D., ROGOZIN, I. B., GAIDAMAKOVA, E. K., ZHAI, M., MAKAROVA, K. S., KOONIN, E. V. & DALY, M. J. (2003). Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4191-6.
- LLOYD, R. G. & BUCKMAN, C. (1985). Identification and genetic analysis of *sbcC* mutations in commonly used *recBC sbcB* strains of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 164, 836-44.
- LLOYD, R. G., PICKSLEY, S. M. & PRESCOTT, C. (1983). Inducible expression of a gene specific to the RecF pathway for recombination in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* 190, 162-7.
- LOPPER, M. E., BOONE, J. & MORROW, C. (2015). *Deinococcus radiodurans* PriA is a Pseudohelicase. *PLoS One* 10, e0133419.
- LU, H., XIA, W., CHEN, H., YIN, L., ZHAO, X., XU, G. & HUA, Y. (2011). Characterization of the role of DR0171 in transcriptional response to radiation in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Arch Microbiol* 193, 741-50.
- LU, X. H., AN, S. Q., TANG, D. J., MCCARTHY, Y., TANG, J. L., DOW, J. M. & RYAN, R. P. (2012). RsmA regulates biofilm formation in *Xanthomonas campestris* through a regulatory network involving cyclic di-GMP and the Clp transcription factor. *PLoS One* 7, e52646.
- LUAN, H., MENG, N., FU, J., CHEN, X., XU, X., FENG, Q., JIANG, H., DAI, J., YUAN, X., LU, Y., ROBERTS, A. A., LUO, X., CHEN, M., XU, S., LI, J., HAMILTON, C. J., FANG, C. & WANG, J. (2014). Genome-wide transcriptome and antioxidant analyses on gamma-irradiated phases of *Deinococcus radiodurans* R1. *PLoS One* 9, e85649.

- LUDANYI, M., BLANCHARD, L., DULERMO, R., BRANDELET, G., BELLANGER, L., PIGNOL, D., LEMAIRE, D. & DE GROOT, A. (2014). Radiation response in *Deinococcus deserti*: IrrE is a metalloprotease that cleaves repressor protein DdrO. *Mol Microbiol* 94, 434-49.
- LUQUE, I., FLORES, E. & HERRERO, A. (1994). Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *EMBO J* 13, 2862-9.
- LUTKENHAUS, J. (2007). Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. *Annu Rev Biochem* 76, 539-62.
- MAGHNOUJ, A., ABU-BAKR, A. A., BAUMBERG, S., STALON, V. & VANDER WAUVEN, C. (2000). Regulation of anaerobic arginine catabolism in *Bacillus licheniformis* by a protein of the Crp/Fnr family. *FEMS Microbiol Lett* 191, 227-34.
- MAKAROVA, K. S., ARAVIND, L., WOLF, Y. I., TATUSOV, R. L., MINTON, K. W., KOONIN, E. V. & 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.
- MAKAROVA, K. S., OMELCHENKO, M. V., GAIDAMAKOVA, E. K., MATROSOVA, V. Y., VASILENKO, A., ZHAI, M., LAPIDUS, A., COPELAND, A., KIM, E., LAND, M., MAVROMMATIS, K., PITLUCK, S., RICHARDSON, P. M., DETTER, C., BRETTIN, T., SAUNDERS, E., LAI, B., RAVEL, B., KEMNER, K. M., WOLF, Y. I., SOROKIN, A., GERASIMOVA, A. V., GELFAND, M. S., FREDRICKSON, J. K., KOONIN, E. V. & DALY, M. J. (2007). *Deinococcus geothermalis*: the pool of extreme radiation resistance genes shrinks. *PLoS One* 2, e955.
- MAKHARASHVILI, N., KOROLEVA, O., BERA, S., GRANDGENETT, D. P. & KOROLEV, S. (2004). A novel structure of DNA repair protein RecO from *Deinococcus radiodurans*. *Structure* 12, 1881-9.
- MARDEN, J. N., DONG, Q., ROYCHOWDHURY, S., BERLEMAN, J. E. & BAUER, C. E. (2011). Cyclic GMP controls *Rhodospirillum centenum* cyst development. *Mol Microbiol* 79, 600-15.
- MARKILLIE, L. M., VARNUM, S. M., HRADECKY, P. & WONG, K. K. (1999). Targeted mutagenesis by duplication insertion in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*: radiation sensitivities of catalase (*katA*) and superoxide dismutase (*sodA*) mutants. *J Bacteriol* 181, 666-9.
- MARSDEN, A. E., INTILE, P. J., SCHULMEYER, K. H., SIMMONS-PATTERSON, E. R., URBANOWSKI, M. L., WOLFGANG, M. C. & YAHR, T. L. (2016). Vfr Directly Activates *exsA* Transcription To Regulate Expression of the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System. *J Bacteriol* 198, 1442-50.
- MARTINEZ-ANTONIO, A. & COLLADO-VIDES, J. (2003). Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 6, 482-9.
- MARTINEZ, A. & KOLTER, R. (1997). Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J Bacteriol* 179, 5188-94.
- MASCARENHAS, J., SANCHEZ, H., TADESSE, S., KIDANE, D., KRISNAMURTHY, M., ALONSO, J. C. & GRAUMANN, P. L. (2006). *Bacillus subtilis* SbcC protein plays an important role in DNA inter-strand cross-link repair. *BMC Mol Biol* 7, 20.
- MASCARENHAS, J., SOPPA, J., STRUNNIKOV, A. V. & GRAUMANN, P. L. (2002). Cell cycle-dependent localization of two novel prokaryotic chromosome segregation and condensation proteins in *Bacillus subtilis* that interact with SMC protein. *EMBO J* 21, 3108-18.
- MASCARENHAS, J., VOLKOV, A. V., RINN, C., SCHIENER, J., GUCKENBERGER, R. & GRAUMANN, P. L. (2005). Dynamic assembly, localization and proteolysis of the *Bacillus subtilis* SMC complex. *BMC Cell Biol* 6, 28.

- MATOBA, K., YAMAZOE, M., MAYANAGI, K., MORIKAWA, K. & HIRAGA, S. (2005). Comparison of MukB homodimer versus MukBEF complex molecular architectures by electron microscopy reveals a higher-order multimerization. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 694-702.
- MATTIMORE, V. & BATTISTA, J. R. (1996). Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *J Bacteriol* 178, 633-7.
- MAURYA, G. K., MODI, K. & MISRA, H. S. (2016). Divisome and segrosome components of *Deinococcus radiodurans* interact through cell division regulatory proteins. *Microbiology* 162, 1321-34.
- MAWER, J. S. & LEACH, D. R. (2014). Branch migration prevents DNA loss during double-strand break repair. *PLoS Genet* 10, e1004485.
- MCCREADY, S. J., OSMAN, F. & YASUI, A. (2000). Repair of UV damage in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mutat Res* 451, 197-210.
- MCKAY, D. B. & STEITZ, T. A. (1981). Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution suggests binding to left-handed B-DNA. *Nature* 290, 744-9.
- MELBY, T. E., CIAMPAGLIO, C. N., BRISCOE, G. & ERICKSON, H. P. (1998). The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge. *J Cell Biol* 142, 1595-604.
- MENGAUD, J., DRAMSI, S., GOUIN, E., VAZQUEZ-BOLAND, J. A., MILON, G. & COSSART, P. (1991). Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Mol Microbiol* 5, 2273-83.
- MENNECIER, S., COSTE, G., SERVANT, P., BAILONE, A. & SOMMER, S. (2004). Mismatch repair ensures fidelity of replication and recombination in the radioresistant organism *Deinococcus radiodurans*. *Mol Genet Genomics* 272, 460-9.
- METTERT, E. L. & KILEY, P. J. (2017). Reassessing the Structure and Function Relationship of the O₂ Sensing Transcription Factor FNR. *Antioxid Redox Signal*.
- MEYER, L., COSTE, G., SOMMER, S., OBERTO, J., CONFALONIERI, F., SERVANT, P. & PASTERNAK, C. (2018). DdrI, a cAMP Receptor Protein Family Member, Acts as a Major Regulator for Adaptation of *Deinococcus radiodurans* to Various Stresses. *J Bacteriol* 200.
- MIERZEJEWSKA, J. & JAGURA-BURDZY, G. (2012). Prokaryotic ParA-ParB-parS system links bacterial chromosome segregation with the cell cycle. *Plasmid* 67, 1-14.
- MILANESIO, P., ARCE-RODRIGUEZ, A., MUNOZ, A., CALLES, B. & DE LORENZO, V. (2011). Regulatory exaptation of the catabolite repression protein (Crp)-cAMP system in *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* 13, 324-39.
- MINNEN, A., ATTAIECH, L., THON, M., GRUBER, S. & VEENING, J. W. (2011). SMC is recruited to oriC by ParB and promotes chromosome segregation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 81, 676-88.
- MINTON, K. W. (1994). DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mol Microbiol* 13, 9-15.
- MINTON, K. W. & DALY, M. J. (1995). A model for repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in the extreme radiophile *Deinococcus radiodurans*. *Bioessays* 17, 457-64.
- MOORE, J., KANTOROW, M., VANDERZWAAG, D. & MCKENNEY, K. (1992). *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein mutants provide evidence for ligand contacts important in activation. *J Bacteriol* 174, 8030-5.
- MORIMATSU, K. & KOWALCZYKOWSKI, S. C. (2003). RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair. *Mol Cell* 11, 1337-47.

- MORIYA, S., RASHID, R. A., RODRIGUES, C. D. & HARRY, E. J. (2010). Influence of the nucleoid and the early stages of DNA replication on positioning the division site in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 76, 634-47.
- MORIYA, S., TSUJIKAWA, E., HASSAN, A. K., ASAI, K., KODAMA, T. & OGASAWARA, N. (1998). A *Bacillus subtilis* gene-encoding protein homologous to eukaryotic SMC motor protein is necessary for chromosome partition. *Mol Microbiol* 29, 179-87.
- MORRISON, D. A., MORTIER-BARRIERE, I., ATTAIECH, L. & CLAVERY, J. P. (2007). Identification of the major protein component of the pneumococcal eclipse complex. *J Bacteriol* 189, 6497-500.
- MOSELEY, B. E. & EVANS, D. M. (1983). Isolation and properties of strains of *Micrococcus* (*Deinococcus*) *radiodurans* unable to excise ultraviolet light-induced pyrimidine dimers from DNA: evidence for two excision pathways. *J Gen Microbiol* 129, 2437-45.
- MOSELEY, B. E. & SETLOW, J. K. (1968). Transformation in *Micrococcus radiodurans* and the ultraviolet sensitivity of its transforming DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61, 176-83.
- MURRAY, R. G., HALL, M. & THOMPSON, B. G. (1983). Cell division in *Deinococcus radiodurans* and a method for displaying septa. *Can J Microbiol* 29, 1412-23.
- MURZIN, A. G. (1993). OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO J* 12, 861-7.
- NAGAI, H., YANO, R., ERICKSON, J. W. & YURA, T. (1990). Transcriptional regulation of the heat shock regulatory gene *rpoH* in *Escherichia coli*: involvement of a novel catabolite-sensitive promoter. *J Bacteriol* 172, 2710-5.
- NAGASHIMA, K., KUBOTA, Y., SHIBATA, T., SAKAGUCHI, C., SHINAGAWA, H. & HISHIDA, T. (2006). Degradation of *Escherichia coli* RecN aggregates by ClpXP protease and its implications for DNA damage tolerance. *J Biol Chem* 281, 30941-6.
- NARUMI, I., SATOH, K., CUI, S., FUNAYAMA, T., KITAYAMA, S. & WATANABE, H. (2004). PprA: a novel protein from *Deinococcus radiodurans* that stimulates DNA ligation. *Mol Microbiol* 54, 278-85.
- NARUMI, I., SATOH, K., KIKUCHI, M., FUNAYAMA, T., YANAGISAWA, T., KOBAYASHI, Y., WATANABE, H. & YAMAMOTO, K. (2001). The LexA protein from *Deinococcus radiodurans* is not involved in RecA induction following gamma irradiation. *J Bacteriol* 183, 6951-6.
- NASMYTH, K. & HAERING, C. H. (2005). The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu Rev Biochem* 74, 595-648.
- NGUYEN, H. H., DE LA TOUR, C. B., TOUEILLE, M., VANNIER, F., SOMMER, S. & SERVANT, P. (2009). The essential histone-like protein HU plays a major role in *Deinococcus radiodurans* nucleoid compaction. *Mol Microbiol* 73, 240-52.
- NIKI, H., JAFFE, A., IMAMURA, R., OGURA, T. & HIRAGA, S. (1991). The new gene *mukB* codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. *EMBO J* 10, 183-93.
- NOONE, D., BOTELLA, E., BUTLER, C., HANSEN, A., JENDE, I. & DEVINE, K. M. (2012). Signal perception by the secretion stress-responsive CsrRS two-component system in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 194, 1800-14.
- NORAIS, C. A., CHITTENI-PATTU, S., WOOD, E. A., INMAN, R. B. & COX, M. M. (2009). DdrB protein, an alternative *Deinococcus radiodurans* SSB induced by ionizing radiation. *J Biol Chem* 284, 21402-11.
- OBIERO, J., PITTET, V., BONDEROFF, S. A. & SANDERS, D. A. (2010). Thioredoxin system from *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 192, 494-501.

- OH, J. I., ERASO, J. M. & KAPLAN, S. (2000). Interacting regulatory circuits involved in orderly control of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J Bacteriol* 182, 3081-7.
- OHBA, H., SATOH, K., SGHAIER, H., YANAGISAWA, T. & NARUMI, I. (2009). Identification of PprM: a modulator of the PprI-dependent DNA damage response in *Deinococcus radiodurans*. *Extremophiles* 13, 471-9.
- OHNIWA, R. L., MORIKAWA, K., KIM, J., OHTA, T., ISHIHAMA, A., WADA, C. & TAKEYASU, K. (2006). Dynamic state of DNA topology is essential for genome condensation in bacteria. *EMBO J* 25, 5591-602.
- OHTANI, N., TOMITA, M. & ITAYA, M. (2010). An extreme thermophile, *Thermus thermophilus*, is a polyploid bacterium. *J Bacteriol* 192, 5499-505.
- OMELCHENKO, M. V., WOLF, Y. I., GAIDAMAKOVA, E. K., MATROSOVA, V. Y., VASILENKO, A., ZHAI, M., DALY, M. J., KOONIN, E. V. & MAKAROVA, K. S. (2005). Comparative genomics of *Thermus thermophilus* and *Deinococcus radiodurans*: divergent routes of adaptation to thermophily and radiation resistance. *BMC Evol Biol* 5, 57.
- PARK, S. Y., MOON, M. W., SUBHADRA, B. & LEE, J. K. (2010). Functional characterization of the glxR deletion mutant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: involvement of GlxR in acetate metabolism and carbon catabolite repression. *FEMS Microbiol Lett* 304, 107-15.
- PARK, Y. H., LEE, B. R., SEOK, Y. J. & PETERKOFKY, A. (2006). In vitro reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 281, 6448-54.
- PARKINSON, G., WILSON, C., GUNASEKERA, A., EBRIGHT, Y. W., EBRIGHT, R. H. & BERMAN, H. M. (1996). Structure of the CAP-DNA complex at 2.5 angstroms resolution: a complete picture of the protein-DNA interface. *J Mol Biol* 260, 395-408.
- PASSOT, F. M., NGUYEN, H. H., DARD-DASCOT, C., THERMES, C., SERVANT, P., ESPELI, O. & SOMMER, S. (2015). Nucleoid organization in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mol Microbiol* 97, 759-74.
- PATZER, S. I. & HANTKE, K. (2001). Dual repression by Fe⁽²⁺⁾ Fur and Mn⁽²⁺⁾ MntR of the *mntH* gene, encoding an NRAMP-like Mn⁽²⁺⁾ transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183, 4806-13.
- PELLEGRINO, S., DE SANCTIS, D., MCSWEENEY, S. & TIMMINS, J. (2011). Expression, purification and preliminary structural analysis of the coiled-coil domain of *Deinococcus radiodurans* RecN. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 68, 218-21.
- PELLEGRINO, S., RADZIMANOWSKI, J., DE SANCTIS, D., BOERI ERBA, E., MCSWEENEY, S. & TIMMINS, J. (2012). Structural and functional characterization of an SMC-like protein RecN: new insights into double-strand break repair. *Structure* 20, 2076-89.
- PELLEGRINO, S., RADZIMANOWSKI, J., MCSWEENEY, S. & TIMMINS, J. (2012). Expression, purification and preliminary structural analysis of the head domain of *Deinococcus radiodurans* RecN. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 68, 81-4.
- PEREZ-CHEEKS, B. A., LEE, C., HAYAMA, R. & MARIANS, K. J. (2012). A role for topoisomerase III in *Escherichia coli* chromosome segregation. *Mol Microbiol* 86, 1007-22.
- PETRUSHENKO, Z. M., LAI, C. H. & RYBENKOV, V. V. (2006). Antagonistic interactions of kleisins and DNA with bacterial Condensin MukB. *J Biol Chem* 281, 34208-17.
- PINHO, M. G., KJOS, M. & VEENING, J. W. (2013). How to get (a)round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria. *Nat Rev Microbiol* 11, 601-14.
- POPOVYCH, N., TZENG, S. R., TONELLI, M., EBRIGHT, R. H. & KALODIMOS, C. G. (2009). Structural basis for cAMP-mediated allosteric control of the catabolite activator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6927-32.

- POSSOZ, C., JUNIER, I. & ESPELI, O. (2012). Bacterial chromosome segregation. *Front Biosci (Landmark Ed)* 17, 1020-34.
- RAJPUROHIT, Y. S., BIHANI, S. C., WALDOR, M. K. & MISRA, H. S. (2016). Phosphorylation of *Deinococcus radiodurans* RecA Regulates Its Activity and May Contribute to Radioresistance. *J Biol Chem* 291, 16672-85.
- RAJPUROHIT, Y. S., DESAI, S. S. & MISRA, H. S. (2013). Pyrroloquinoline quinone and a quinoprotein kinase support gamma-radiation resistance in *Deinococcus radiodurans* and regulate gene expression. *J Basic Microbiol* 53, 518-31.
- RAJPUROHIT, Y. S. & MISRA, H. S. (2010). Characterization of a DNA damage-inducible membrane protein kinase from *Deinococcus radiodurans* and its role in bacterial radioresistance and DNA strand break repair. *Mol Microbiol* 77, 1470-82.
- RAJPUROHIT, Y. S. & MISRA, H. S. (2013). Structure-function study of deinococcal serine/threonine protein kinase implicates its kinase activity and DNA repair protein phosphorylation roles in radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *Int J Biochem Cell Biol* 45, 2541-52.
- RAMIREZ-ARCOS, S., SZETO, J., BEVERIDGE, T., VICTOR, C., FRANCIS, F. & DILLON, J. (2001). Deletion of the cell-division inhibitor MinC results in lysis of *Neisseria gonorrhoeae*. *Microbiology* 147, 225-37.
- REDDY, M. C., PALANINATHAN, S. K., BRUNING, J. B., THURMAN, C., SMITH, D. & SACCHETTINI, J. C. (2009). Structural insights into the mechanism of the allosteric transitions of *Mycobacterium tuberculosis* cAMP receptor protein. *J Biol Chem* 284, 36581-91.
- REDFIELD, R. J., CAMERON, A. D., QIAN, Q., HINDS, J., ALI, T. R., KROLL, J. S. & LANGFORD, P. R. (2005). A novel CRP-dependent regulon controls expression of competence genes in *Haemophilus influenzae*. *J Mol Biol* 347, 735-47.
- REON, B. J., NGUYEN, K. H., BHATTACHARYYA, G. & GROVE, A. (2012). Functional comparison of *Deinococcus radiodurans* Dps proteins suggests distinct in vivo roles. *Biochem J* 447, 381-91.
- REYES-LAMOTHE, R., NICOLAS, E. & SHERRATT, D. J. (2012). Chromosome replication and segregation in bacteria. *Annu Rev Genet* 46, 121-43.
- REYES, E. D., PATIDAR, P. L., URANGA, L. A., BORTOLETTO, A. S. & LUSETTI, S. L. (2010). RecN is a cohesin-like protein that stimulates intermolecular DNA interactions in vitro. *J Biol Chem* 285, 16521-9.
- RHODIUS, V. A. & BUSBY, S. J. (2000). Transcription activation by the *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein: determinants within activating region 3. *J Mol Biol* 299, 295-310.
- RICKMAN, L., SCOTT, C., HUNT, D. M., HUTCHINSON, T., MENENDEZ, M. C., WHALAN, R., HINDS, J., COLSTON, M. J., GREEN, J. & BUXTON, R. S. (2005). A member of the cAMP receptor protein family of transcription regulators in *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence in mice and controls transcription of the *rpfA* gene coding for a resuscitation promoting factor. *Mol Microbiol* 56, 1274-86.
- RILEY, S. P., BYKOWSKI, T., COOLEY, A. E., BURNS, L. H., BABB, K., BRISSETTE, C. A., BOWMAN, A., ROTONDI, M., MILLER, M. C., DEMOLL, E., LIM, K., FRIED, M. G. & STEVENSON, B. (2009). *Borrelia burgdorferi* EbfC defines a newly-identified, widespread family of bacterial DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* 37, 1973-83.
- RONCARATI, D. & SCARLATO, V. (2017). Regulation of heat-shock genes in bacteria: from signal sensing to gene expression output. *FEMS Microbiol Rev* 41, 549-574.
- ROTHFUSS, H., LARA, J. C., SCHMID, A. K. & LIDSTROM, M. E. (2006). Involvement of the S-layer proteins Hpi and SlpA in the maintenance of cell envelope integrity in *Deinococcus radiodurans* R1. *Microbiology* 152, 2779-87.

- ROUVIERE-YANIV, J., YANIV, M. & GERMOND, J. E. (1979). *E. coli* DNA binding protein HU forms nucleosomelike structure with circular double-stranded DNA. *Cell* 17, 265-74.
- ROYCHOWDHURY, S., DONG, Q. & BAUER, C. E. (2015). DNA-binding properties of a cGMP-binding CRP homologue that controls development of metabolically dormant cysts of *Rhodospirillum centenum*. *Microbiology* 161, 2256-64.
- SAKAI, A. & COX, M. M. (2009). RecFOR and RecOR as distinct RecA loading pathways. *J Biol Chem* 284, 3264-72.
- SANCHEZ, H. & ALONSO, J. C. (2005). *Bacillus subtilis* RecN binds and protects 3'-single-stranded DNA extensions in the presence of ATP. *Nucleic Acids Res* 33, 2343-50.
- SANCHEZ, H., KIDANE, D., CASTILLO COZAR, M., GRAUMANN, P. L. & ALONSO, J. C. (2006). Recruitment of *Bacillus subtilis* RecN to DNA double-strand breaks in the absence of DNA end processing. *J Bacteriol* 188, 353-60.
- SATOH, K., OHBA, H., SGHAIER, H. & NARUMI, I. (2006). Down-regulation of radioresistance by LexA2 in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology* 152, 3217-26.
- SAWITZKE, J. A. & AUSTIN, S. (2000). Suppression of chromosome segregation defects of *Escherichia coli* muk mutants by mutations in topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1671-6.
- SCHLEIFFER, A., KAITNA, S., MAURER-STROH, S., GLOTZER, M., NASMYTH, K. & EISENHABER, F. (2003). Kleisins: a superfamily of bacterial and eukaryotic SMC protein partners. *Mol Cell* 11, 571-5.
- SCHLESINGER, D. J. (2007). Role of RecA in DNA damage repair in *Deinococcus radiodurans*. *FEMS Microbiol Lett* 274, 342-7.
- SCHMID, A. K., HOWELL, H. A., BATTISTA, J. R., PETERSON, S. N. & LIDSTROM, M. E. (2005a). Global transcriptional and proteomic analysis of the Sig1 heat shock regulon of *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 187, 3339-51.
- SCHMID, A. K., HOWELL, H. A., BATTISTA, J. R., PETERSON, S. N. & LIDSTROM, M. E. (2005b). HspR is a global negative regulator of heat shock gene expression in *Deinococcus radiodurans*. *Mol Microbiol* 55, 1579-90.
- SCHMID, A. K. & LIDSTROM, M. E. (2002). Involvement of two putative alternative sigma factors in stress response of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 184, 6182-9.
- SCHULTZ, J. E. & MATIN, A. (1991). Molecular and functional characterization of a carbon starvation gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 218, 129-40.
- SCHUMANN, W. (2016). Regulation of bacterial heat shock stimulons. *Cell Stress Chaperones* 21, 959-968.
- SCOTT, C., GUEST, J. R. & GREEN, J. (2000). Characterization of the *Lactococcus lactis* transcription factor FlpA and demonstration of an in vitro switch. *Mol Microbiol* 35, 1383-93.
- SEAVER, L. C. & IMLAY, J. A. (2001). Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183, 7173-81.
- SELVAM, K., DUNCAN, J. R., TANAKA, M. & BATTISTA, J. R. (2013). DdrA, DdrD, and PprA: components of UV and mitomycin C resistance in *Deinococcus radiodurans* R1. *PLoS One* 8, e69007.
- SEO, H. J. & LEE, Y. N. (2006). Occurrence of thioredoxin reductase in *Deinococcus* species, the UV resistant bacteria. *J Microbiol* 44, 461-5.
- SERVANT, P., JOLIVET, E., BENTCHIKOU, E., MENNECIER, S., BAILONE, A. & SOMMER, S. (2007). The ClpPX protease is required for radioresistance and regulates cell division after gamma-irradiation in *Deinococcus radiodurans*. *Mol Microbiol* 66, 1231-9.

- SHARMA, H., YU, S., KONG, J., WANG, J. & STEITZ, T. A. (2009). Structure of apo-CAP reveals that large conformational changes are necessary for DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16604-9.
- SHARROCKS, A. D., GREEN, J. & GUEST, J. R. (1991). FNR activates and represses transcription in vitro. *Proc Biol Sci* 245, 219-26.
- SHAW, D. J., RICE, D. W. & GUEST, J. R. (1983). Homology between CAP and Fnr, a regulator of anaerobic respiration in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 166, 241-7.
- SHEEHAN, B., KLARSFELD, A., EBRIGHT, R. & COSSART, P. (1996). A single substitution in the putative helix-turn-helix motif of the pleiotropic activator PrfA attenuates *Listeria monocytogenes* virulence. *Mol Microbiol* 20, 785-97.
- SHELVER, D., KERBY, R. L., HE, Y. & ROBERTS, G. P. (1997). CooA, a CO-sensing transcription factor from *Rhodospirillum rubrum*, is a CO-binding heme protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11216-20.
- SHENG, D., ZHENG, Z., TIAN, B., SHEN, B. & HUA, Y. (2004). LexA analog (dra0074) is a regulatory protein that is irrelevant to recA induction. *J Biochem* 136, 787-93.
- SHENOY, A. R., SREENATH, N., PODOBNIK, M., KOVACEVIC, M. & VISWESWARIAH, S. S. (2005). The Rv0805 gene from *Mycobacterium tuberculosis* encodes a 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase: biochemical and mutational analysis. *Biochemistry* 44, 15695-704.
- SHEREDA, R. D., KOZLOV, A. G., LOHMAN, T. M., COX, M. M. & KECK, J. L. (2008). SSB as an organizer/mobilizer of genome maintenance complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43, 289-318.
- SHIMADA, T., FUJITA, N., YAMAMOTO, K. & ISHIHAMA, A. (2011). Novel roles of cAMP receptor protein (CRP) in regulation of transport and metabolism of carbon sources. *PLoS One* 6, e20081.
- SIVANATHAN, V., EMERSON, J. E., PAGES, C., CORNET, F., SHERRATT, D. J. & ARCISZEWSKA, L. K. (2009). KOPS-guided DNA translocation by FtsK safeguards *Escherichia coli* chromosome segregation. *Mol Microbiol* 71, 1031-42.
- SLADE, D., LINDNER, A. B., PAUL, G. & RADMAN, M. (2009). Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans*. *Cell* 136, 1044-55.
- SLADE, D. & RADMAN, M. (2011). Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 133-91.
- SMIDT, H., VAN LEEST, M., VAN DER OOST, J. & DE VOS, W. M. (2000). Transcriptional regulation of the cpr gene cluster in ortho-chlorophenol-respiring *Desulfitobacterium dehalogenans*. *J Bacteriol* 182, 5683-91.
- SMITS, W. K., DUBOIS, J. Y., BRON, S., VAN DIJL, J. M. & KUIPERS, O. P. (2005). Tricky business: transcriptome analysis reveals the involvement of thioredoxin A in redox homeostasis, oxidative stress, sulfur metabolism, and cellular differentiation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 187, 3921-30.
- SOBERON-CHAVEZ, G., ALCARAZ, L. D., MORALES, E., PONCE-SOTO, G. Y. & SERVIN-GONZALEZ, L. (2017). The Transcriptional Regulators of the CRP Family Regulate Different Essential Bacterial Functions and Can Be Inherited Vertically and Horizontally. *Front Microbiol* 8, 959.
- SOPPA, J., KOBAYASHI, K., NOIROT-GROS, M. F., OESTERHELT, D., EHRlich, S. D., DERVYN, E., OGASAWARA, N. & MORIYA, S. (2002). Discovery of two novel families of proteins that are proposed to interact with prokaryotic SMC proteins, and characterization of the *Bacillus subtilis* family members ScpA and ScpB. *Mol Microbiol* 45, 59-71.
- SPIRO, S. (1994). The FNR family of transcriptional regulators. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66, 23-36.

- SPIRO, S. & GUEST, J. R. (1990). FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* 6, 399-428.
- SRIVENUGOPAL, K.S., LOCKSHON, D. & MORRIS, D. R. (1984). *Escherichia coli* DNA topoisomerase III: purification and characterization of a new type I enzyme. *Biochemistry* 23, 1899-906.
- STAHL, W., JUNGHANS, A., DE BOER, B., DRIOMINA, E. S., BRIVIBA, K. & SIES, H. (1998). Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of lycopene and lutein. *FEBS Lett* 427, 305-8.
- STAPLETON, M., HAQ, I., HUNT, D. M., ARNVIG, K. B., ARTYMIUK, P. J., BUXTON, R. S. & GREEN, J. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* cAMP receptor protein (Rv3676) differs from the *Escherichia coli* paradigm in its cAMP binding and DNA binding properties and transcription activation properties. *J Biol Chem* 285, 7016-27.
- STECK, T. R. & DRLICA, K. (1984). Bacterial chromosome segregation: evidence for DNA gyrase involvement in decatenation. *Cell* 36, 1081-8.
- STEELE, V. R., BOTTOMLEY, A. L., GARCIA-LARA, J., KASTURIARACHCHI, J. & FOSTER, S. J. (2011). Multiple essential roles for EzrA in cell division of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 80, 542-55.
- STERNGLANZ, R., DINARDO, S., VOELKEL, K. A., NISHIMURA, Y., HIROTA, Y., BECHERER, K., ZUMSTEIN, L. & WANG, J. C. (1981). Mutations in the gene coding for *Escherichia coli* DNA topoisomerase I affect transcription and transposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 2747-51.
- STORZ, G. & IMLAY, J. A. (1999). Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* 2, 188-94.
- STRAUS, D. B., WALTER, W. A. & GROSS, C. A. (1987). The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of sigma 32. *Nature* 329, 348-51.
- STRUNNIKOV, A. V. (2006). SMC complexes in bacterial chromosome condensation and segregation. *Plasmid* 55, 135-44.
- STULKE, J. & HILLEN, W. (1999). Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2, 195-201.
- SUGIMAN-MARANGOS, S. & JUNOP, M. S. (2010). The structure of DdrB from *Deinococcus*: a new fold for single-stranded DNA binding proteins. *Nucleic Acids Res* 38, 3432-40.
- SUN, H., LI, M., XU, G., CHEN, H., JIAO, J., TIAN, B., WANG, L. & HUA, Y. (2012). Regulation of MntH by a dual Mn(II) and Fe(II)-dependent transcriptional repressor (DR2539) in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS One* 7, e35057.
- SUSKI, C. & MARIANS, K. J. (2008). Resolution of converging replication forks by RecQ and topoisomerase III. *Mol Cell* 30, 779-89.
- SWEET, D. M. & MOSELEY, B. E. (1976). The resistance of *Micrococcus radiodurans* to killing and mutation by agents which damage DNA. *Mutat Res* 34, 175-86.
- SZETO, J., RAMIREZ-ARCOS, S., RAYMOND, C., HICKS, L. D., KAY, C. M. & DILLON, J. A. (2001). Gonococcal MinD affects cell division in *Neisseria gonorrhoeae* and *Escherichia coli* and exhibits a novel self-interaction. *J Bacteriol* 183, 6253-64.
- TAKAHASHI, M., BLAZY, B. & BAUDRAS, A. (1980). An equilibrium study of the cooperative binding of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate to the adenosine cyclic 3',5'-monophosphate receptor protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 19, 5124-30.
- TAKAHASHI, M., BLAZY, B., BAUDRAS, A. & HILLEN, W. (1989). Ligand-modulated binding of a gene regulatory protein to DNA. Quantitative analysis of cyclic-AMP induced binding of CRP from *Escherichia coli* to non-specific and specific DNA targets. *J Mol Biol* 207, 783-96.
- TANAKA, M., EARL, A. M., HOWELL, H. A., PARK, M. J., EISEN, J. A., PETERSON, S. N. & 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.
- TANAKA, M., NARUMI, I., FUNAYAMA, T., KIKUCHI, M., WATANABE, H., MATSUNAGA, T., NIKAIDO, O. & YAMAMOTO, K. (2005). Characterization of pathways dependent on the *uvrE*, *uvrA1*, or *uvrA2* gene product for UV resistance in *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 187, 3693-7.
- THANASSI, J. A., HARTMAN-NEUMANN, S. L., DOUGHERTY, T. J., DOUGHERTY, B. A. & PUCCI, M. J. (2002). Identification of 113 conserved essential genes using a high-throughput gene disruption system in *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* 30, 3152-62.
- TIAN, B., SUN, Z., SHEN, S., WANG, H., JIAO, J., WANG, L., HU, Y. & HUA, Y. (2009). Effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* on protein oxidation. *Lett Appl Microbiol* 49, 689-94.
- TIAN, B., WU, Y., SHENG, D., ZHENG, Z., GAO, G. & HUA, Y. (2004). Chemiluminescence assay for reactive oxygen species scavenging activities and inhibition on oxidative damage of DNA in *Deinococcus radiodurans*. *Luminescence* 19, 78-84.
- TIAN, B., XU, Z., SUN, Z., LIN, J. & HUA, Y. (2007). Evaluation of the antioxidant effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* through targeted mutagenesis, chemiluminescence, and DNA damage analyses. *Biochim Biophys Acta* 1770, 902-11.
- TIAN, C. F., GARNERONE, A. M., MATHIEU-DEMAZIERE, C., MASSON-BOIVIN, C. & BATUT, J. (2012). Plant-activated bacterial receptor adenylate cyclases modulate epidermal infection in the *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago* symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 6751-6.
- TIRGARI, S., AND B. E. MOSELEY. (1980). Transformation in *Micrococcus radiodurans*: measurement of various parameters and evidence for multiple, independently segregating genomes per cell. *J. Gen. Microbiol.* 119, 287-296.
- TOMASZ, A. (1966). Model for the mechanism controlling the expression of competent state in *Pneumococcus* cultures. *J Bacteriol* 91, 1050-61.
- TOMLINSON, S. R., TUTAR, Y. & HARMAN, J. G. (2006). CRP subunit association and hinge conformation changes in response to cAMP binding: analysis of C-helix cysteine-substituted CRP. *Biochemistry* 45, 13438-46.
- TOSQUES, I. E., SHI, J. & SHAPLEIGH, J. P. (1996). Cloning and characterization of *nnrR*, whose product is required for the expression of proteins involved in nitric oxide metabolism in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *J Bacteriol* 178, 4958-64.
- TOUEILLE, M., MIRABELLA, B., GUERIN, P., BOUTHER DE LA TOUR, C., BOISNARD, S., NGUYEN, H. H., BLANCHARD, L., SERVANT, P., DE GROOT, A., SOMMER, S. & ARMENGAUD, J. (2012). A comparative proteomic approach to better define *Deinococcus* nucleoid specificities. *J Proteomics* 75, 2588-600.
- TRUN, N. & JOHNSTON, D. (2003). Folding chromosomes in bacteria: examining the role of Csp proteins and other small nucleic acid-binding proteins. *Curr Top Dev Biol* 55, 173-201.
- TSAI, C. H., LIAO, R., CHOU, B. & CONTRERAS, L. M. (2015). Transcriptional analysis of *Deinococcus radiodurans* reveals novel small RNAs that are differentially expressed under ionizing radiation. *Appl Environ Microbiol* 81, 1754-64.
- TSAI, M. J., WANG, J. R., YANG, C. D., KAO, K. C., HUANG, W. L., HUANG, H. Y., TSENG, C. P., HUANG, H. D. & HO, S. Y. (2018). PredCRP: predicting and analysing the regulatory roles of CRP from its binding sites in *Escherichia coli*. *Sci Rep* 8, 951.
- UDUPA, K. S., O'CAIN, P. A., MATTIMORE, V. & BATTISTA, J. R. (1994). Novel ionizing radiation-sensitive mutants of *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 176, 7439-46.

- UL HUSSAIN SHAH, A. M., ZHAO, Y., WANG, Y., YAN, G., ZHANG, Q., WANG, L., TIAN, B., CHEN, H. & HUA, Y. (2014). A Mur regulator protein in the extremophilic bacterium *Deinococcus radiodurans*. *PLoS One* 9, e106341.
- ULLSPERGER, C. & COZZARELLI, N. R. (1996). Contrasting enzymatic activities of topoisomerase IV and DNA gyrase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 271, 31549-55.
- URANGA, L. A., REYES, E. D., PATIDAR, P. L., REDMAN, L. N. & LUSSETTI, S. L. (2017). The cohesin-like RecN protein stimulates RecA-mediated recombinational repair of DNA double-strand breaks. *Nat Commun* 8, 15282.
- VAN SPANNING, R. J., DE BOER, A. P., REIJNDERS, W. N., SPIRO, S., WESTERHOFF, H. V., STOUTHAMER, A. H. & VAN DER OOST, J. (1995). Nitrite and nitric oxide reduction in *Paracoccus denitrificans* is under the control of NNR, a regulatory protein that belongs to the FNR family of transcriptional activators. *FEBS Lett* 360, 151-4.
- VICENTE, M. & LOWE, J. (2003). Ring, helix, sphere and cylinder: the basic geometry of prokaryotic cell division. *EMBO Rep* 4, 655-60.
- VICKRIDGE, E., PLANCHENAULT, C., COCKRAM, C., JUNCEDA, I. G. & ESPELI, O. (2017). Management of *E. coli* sister chromatid cohesion in response to genotoxic stress. *Nat Commun* 8, 14618.
- VOLKOV, A., MASCARENHAS, J., ANDREI-SELMER, C., ULRICH, H. D. & GRAUMANN, P. L. (2003). A prokaryotic condensin/cohesin-like complex can actively compact chromosomes from a single position on the nucleoid and binds to DNA as a ring-like structure. *Mol Cell Biol* 23, 5638-50.
- VON SONNTAG, C. (2006). Free-radical-induced DNA damage and its repair. In: Springer-Verlag (ed). Berlin/Heidelberg, pp.
- VUJICIC-ZAGAR, A., DULERMO, R., LE GORREC, M., VANNIER, F., SERVANT, P., SOMMER, S., DE GROOT, A. & SERRE, L. (2009). Crystal structure of the IrrE protein, a central regulator of DNA damage repair in deinococcaceae. *J Mol Biol* 386, 704-16.
- WALSH, N. P., ALBA, B. M., BOSE, B., GROSS, C. A. & SAUER, R. T. (2003). OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell* 113, 61-71.
- WANG, H., WANG, F., HUA, X., MA, T., CHEN, J., XU, X., WANG, L., TIAN, B. & HUA, Y. (2012). Genetic and biochemical characteristics of the histone-like protein DR0199 in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology* 158, 936-43.
- WANG, J. C. (1985). DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 54, 665-97.
- WANG, L., XU, G., CHEN, H., ZHAO, Y., XU, N., TIAN, B. & HUA, Y. (2008). DrRRA: a novel response regulator essential for the extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *Mol Microbiol* 67, 1211-22.
- WANG, P. & SCHELLHORN, H. E. (1995). Induction of resistance to hydrogen peroxide and radiation in *Deinococcus radiodurans*. *Can J Microbiol* 41, 170-6.
- WANG, T. C. & SMITH, K. C. (1988). Different effects of recJ and recN mutations on the postreplication repair of UV-damaged DNA in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 170, 2555-9.
- WANG, Y., XU, Q., LU, H., LIN, L., WANG, L., XU, H., CUI, X., ZHANG, H., LI, T. & 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.
- WEISBURG, W. G., GIOVANNONI, S. J. & WOESE, C. R. (1989). The *Deinococcus-Thermus* phylum and the effect of rRNA composition on phylogenetic tree construction. *Syst Appl Microbiol* 11, 128-34.
- WELLER, G. R., KYSELA, B., ROY, R., TONKIN, L. M., SCANLAN, E., DELLA, M., DEVINE, S. K., DAY, J. P., WILKINSON, A., D'ADDA DI FAGAGNA, F., DEVINE, K. M., BOWATER, R.

- P., JEGGO, P. A., JACKSON, S. P. & DOHERTY, A. J. (2002). Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science* 297, 1686-9.
- WESTERS, H., WESTERS, L., DARMON, E., VAN DIJL, J. M., QUAX, W. J. & ZANEN, G. (2006). The CsxRS two-component regulatory system controls a general secretion stress response in *Bacillus subtilis*. *FEBS J* 273, 3816-27.
- WHITE, O., EISEN, J. A., HEIDELBERG, J. F., HICKEY, E. K., PETERSON, J. D., DODSON, R. J., HAFT, D. H., GWINN, M. L., NELSON, W. C., RICHARDSON, D. L., MOFFAT, K. S., QIN, H., JIANG, L., PAMPHILE, W., CROSBY, M., SHEN, M., VAMATHEVAN, J. J., LAM, P., McDONALD, L., UTTERBACK, T., ZALEWSKI, C., MAKAROVA, K. S., ARAVIND, L., DALY, M. J., MINTON, K. W., FLEISCHMANN, R. D., KETCHUM, K. A., NELSON, K. E., SALZBERG, S., SMITH, H. O., VENTER, J. C. & FRASER, C. M. (1999). Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* 286, 1571-7.
- WONG-EKKABUT, J., XU, Z., TRIAMPO, W., TANG, I. M., TIELEMAN, D. P. & MONTICELLI, L. (2007). Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys J* 93, 4225-36.
- WORK, E. (1964). Amino acids of walls of *Micrococcus radiodurans*. *Nature* 201, 1107-1109.
- WRIGHT, W. D., SHAH, S. S. & HEYER, W. D. (2018). Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 293, 10524-10535.
- WU, L. J. J. E. (2012). Nucleoid occlusion and bacterial cell division. *Nature reviews Microbiology* 10, 8-12.
- WYMAN, C. & KANAAR, R. (2006). DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet* 40, 363-83.
- XI, L., QIAO, N., ZHANG, J., LI, J., LIU, D., YOU, J. & LIU, J. (2018). *Deinococcus petrolearius* sp. nov. isolated from crude oil recovery water in China. *Antonie Van Leeuwenhoek* 111, 353-360.
- XU, G., LU, H., WANG, L., CHEN, H., XU, Z., HU, Y., TIAN, B. & HUA, Y. (2010). DdrB stimulates single-stranded DNA annealing and facilitates RecA-independent DNA repair in *Deinococcus radiodurans*. *DNA Repair (Amst)* 9, 805-12.
- XU, G., WANG, L., CHEN, H., LU, H., YING, N., TIAN, B. & HUA, Y. (2008). RecO is essential for DNA damage repair in *Deinococcus radiodurans*. *J Bacteriol* 190, 2624-8.
- XU, W., SHEN, J., DUNN, C. A., DESAI, S. & BESSMAN, M. J. (2001). The Nudix hydrolases of *Deinococcus radiodurans*. *Mol Microbiol* 39, 286-90.
- YAMANAKA, K., OGURA, T., NIKI, H. & HIRAGA, S. (1996). Identification of two new genes, mukE and mukF, involved in chromosome partitioning in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 250, 241-51.
- YAMAZOE, M., ONOGI, T., SUNAKO, Y., NIKI, H., YAMANAKA, K., ICHIMURA, T. & HIRAGA, S. (1999). Complex formation of MukB, MukE and MukF proteins involved in chromosome partitioning in *Escherichia coli*. *EMBO J* 18, 5873-84.
- YANG, S., XU, H., WANG, J., LIU, C., LU, H., LIU, M., ZHAO, Y., TIAN, B., WANG, L. & HUA, Y. (2016). Cyclic AMP Receptor Protein Acts as a Transcription Regulator in Response to Stresses in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS One* 11, e0155010.
- YIN, L., WANG, L., LU, H., XU, G., CHEN, H., ZHAN, H., TIAN, B. & HUA, Y. (2010). DRA0336, another OxyR homolog, involved in the antioxidation mechanisms in *Deinococcus radiodurans*. *J Microbiol* 48, 473-9.
- YONEMASU, R., MCCREADY, S. J., MURRAY, J. M., OSMAN, F., TAKAO, M., YAMAMOTO, K., LEHMANN, A. R. & YASUI, A. (1997). Characterization of the alternative excision repair pathway of UV-damaged DNA in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* 25, 1553-8.

- YOSHINAKA, T., K. YANO, AND H. YAMAGUCHI. (1973). Isolation of highly radioresistant bacterium, *Arthrobacter radiotolerans* nov. sp. *Agric. Biol. Chem.* 37, 2269-2275.
- YU, S. & LEE, J. C. (2004). Role of residue 138 in the interdomain hinge region in transmitting allosteric signals for DNA binding in *Escherichia coli* cAMP receptor protein. *Biochemistry* 43, 4662-9.
- YU, X. C., WEIHE, E. K. & MARGOLIN, W. (1998). Role of the C terminus of FtsK in *Escherichia coli* chromosome segregation. *J Bacteriol* 180, 6424-8.
- YUAN, M., ZHANG, W., DAI, S., WU, J., WANG, Y., TAO, T., CHEN, M. & LIN, M. (2009). *Deinococcus gobiensis* sp. nov., an extremely radiation-resistant bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 1513-7.
- ZAHRADKA, K., SLADE, D., BAILONE, A., SOMMER, S., AVERBECK, D., PETRANOVIC, M., LINDNER, A. B. & RADMAN, M. (2006). Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. *Nature* 443, 569-73.
- ZECHIEDRICH, E. L., KHODURSKY, A. B., BACHELLIER, S., SCHNEIDER, R., CHEN, D., LILLEY, D. M. & COZZARELLI, N. R. (2000). Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 275, 8103-13.
- ZENG, Y., MA, Y., XIAO, F., WANG, W. & HE, S. (2017). Knockout of pprM Decreases Resistance to Desiccation and Oxidation in *Deinococcus radiodurans*. *Indian J Microbiol* 57, 316-321.
- ZHANG, C., WEI, J., ZHENG, Z., YING, N., SHENG, D. & HUA, Y. (2005). Proteomic analysis of *Deinococcus radiodurans* recovering from gamma-irradiation. *Proteomics* 5, 138-43.
- ZHANG, Y. M., WONG, T. Y., CHEN, L. Y., LIN, C. S. & LIU, J. K. (2000). Induction of a futile Embden-Meyerhof-Parnas pathway in *Deinococcus radiodurans* by Mn: possible role of the pentose phosphate pathway in cell survival. *Appl Environ Microbiol* 66, 105-12.
- ZHANG, L., Yang Q., LUO X., FANG C., ZHANG Q., TANG Y. (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. *Arch Microbiol* 188, 411-9.
- ZHENG, D., CONSTANTINIDOU, C., HOBMAN, J. L. & MINCHIN, S. D. (2004). Identification of the CRP regulon using in vitro and in vivo transcriptional profiling. *Nucleic Acids Res* 32, 5874-93.
- ZHENG, M., ASLUND, F. & STORZ, G. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279, 1718-21.
- ZHU, H., WANG, L. K. & SHUMAN, S. (2005). Essential constituents of the 3'-phosphoesterase domain of bacterial DNA ligase D, a nonhomologous end-joining enzyme. *J Biol Chem* 280, 33707-15.
- ZIMMER, C., STORL, K. & STORL, J. (1990). Microbial DNA topoisomerases and their inhibition by antibiotics. *J Basic Microbiol* 30, 209-24.
- ZIMMERMAN, J. M. & BATTISTA, J. R. (2005). A ring-like nucleoid is not necessary for radioresistance in the *Deinococcaceae*. *BMC Microbiol* 5, 17.
- ZSCHIEDRICH, C. P., KEIDEL, V. & SZURMANT, H. (2016). Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *J Mol Biol* 428, 3752-75.
- ZUBER, U. & SCHUMANN, W. (1994). CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon dnaK of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 176, 1359-63.

ANNEXE: Article 3

In vivo and in vitro characterization of DdrC, a DNA damage response protein in *Deinococcus radiodurans* bacterium.

RESEARCH ARTICLE

In vivo and *in vitro* characterization of DdrC, a DNA damage response protein in *Deinococcus radiodurans* bacterium

Claire Bouthier de la Tour^{1*}, Martine Mathieu¹, Laura Meyer¹, Pauline Dupaigne², Fanny Passot^{1‡}, Pascale Servant¹, Suzanne Sommer¹, Eric Le Cam², Fabrice Confalonieri¹

1 Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gif sur Yvette cedex, France, **2** Signalisations, Noyaux et Innovations en Cancérologie, UMR 8126, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gustave Roussy, 114 rue E. Vaillant, Villejuif, France

‡ Current address: Molecular Cell Biology unit, Biology Department, Lund University, Lund, Sweden

* claire.bouthier@i2bc.paris-saclay.fr



OPEN ACCESS

Citation: Bouthier de la Tour C, Mathieu M, Meyer L, Dupaigne P, Passot F, Servant P, et al. (2017) *In vivo* and *in vitro* characterization of DdrC, a DNA damage response protein in *Deinococcus radiodurans* bacterium. PLoS ONE 12(5): e0177751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177751>

Editor: Arthur J. Lustig, Tulane University Health Sciences Center, UNITED STATES

Received: February 23, 2017

Accepted: May 2, 2017

Published: May 18, 2017

Copyright: © 2017 Bouthier de la Tour et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the University Paris-Sud, Electricité de France (RB2017-02 to FC), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-12-BSV8-0012 to ELC) and the foundation ARC (program SLS220120605310 to ELC). The funders had no role in study design, data

Abstract

The bacterium *Deinococcus radiodurans* possesses a set of *Deinococcus*-specific genes highly induced after DNA damage. Among them, *ddrC* (*dr0003*) was recently re-annotated, found to be in the inverse orientation and called *A2G07_00380*. Here, we report the first *in vivo* and *in vitro* characterization of the corrected DdrC protein to better understand its function in irradiated cells. *In vivo*, the $\Delta ddrC$ null mutant is sensitive to high doses of UV radiation and the *ddrC* deletion significantly increases UV-sensitivity of $\Delta uvrA$ or $\Delta uvsE$ mutant strains. We show that the expression of the DdrC protein is induced after γ -irradiation and is under the control of the regulators, DdrO and IrrE. DdrC is rapidly recruited into the nucleoid of the irradiated cells. *In vitro*, we show that DdrC is able to bind single- and double-stranded DNA with a preference for the single-stranded DNA but without sequence or shape specificity and protects DNA from various nuclease attacks. DdrC also condenses DNA and promotes circularization of linear DNA. Finally, we show that the purified protein exhibits a DNA strand annealing activity. Altogether, our results suggest that DdrC is a new DNA binding protein with pleiotropic activities. It might maintain the damaged DNA fragments end to end, thus limiting their dispersion and extensive degradation after exposure to ionizing radiation. DdrC might also be an accessory protein that participates in a single strand annealing pathway whose importance in DNA repair becomes apparent when DNA is heavily damaged.

Introduction

The *Deinococcus radiodurans* bacterium is known for its exceptional resistance to the lethal effects of ionizing radiation, ultraviolet light and other DNA-damaging agents. Its radioresistance results from a combination of different mechanisms, such as protection of proteins against oxidation, efficient DNA double strand break repair, and a nucleoid structure favoring the maintenance of DNA fragment cohesion after irradiation (for reviews see [1–5]). Transcriptome analysis of cells recovering from exposure to ionizing radiation or desiccation

collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: Fundings received from Electricité de France do not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

showed complex changes in the expression profile of genes belonging to diverse functional categories [6,7]. Among the 10 most highly up-regulated genes, *ddrA*, *ddrB*, *pprA*, *ddrC* and *ddrD* were specific to *Deinococcaceae*. The DdrA, DdrB, and PprA proteins are DNA binding proteins that have been shown to be involved in radioresistance [7]. They have been extensively characterized *in vivo* and *in vitro*. DdrB promotes a single-strand annealing reaction (SSA), playing an important role for the assembly of small chromosomal fragments produced by high radiation exposure [8–10]. DdrA preferentially binds *in vitro* to 3' single-stranded DNA ends and was proposed to be part of an end-protection system [11,12]. PprA was shown to protect DNA against degradation by nucleases, to stimulate DNA ligase activity [13] and was recently proposed to be involved in chromosome segregation after completion of DNA repair [14–16]. Single deletion of *ddrD* or *ddrC* gene was described as having no detectable effect on the level of resistance to γ -rays, UV irradiation, or MMC treatment [7,17]. However, when combined with a *ddrB* deletion, the absence of the *ddrC* gene increased significantly the sensitivity to DNA-damaging agents of the single Δ *ddrB* mutant [7,17], suggesting that the DdrC protein might also play a role in DNA damage tolerance.

The *D. radiodurans ddrC* gene was first annotated as *dr0003* on the forward strand of *D. radiodurans* chromosome 1 [18,19]. More recently, various proteomic and genomic approaches performed on the *D. deserti* genome showed that the *ddrC* gene (*Deide_23280*) is encoded by the reverse strand [20]. The corrected *ddrC* gene is now reported under the name *A2G07_003810* after resequencing of the *D. radiodurans* R1 genome [21]. In the new orientation, a 17 bp palindromic cis-regulatory element named RDRM (Radiation Desiccation Response Motif), located upstream the coding sequence, was found [20]. A set of about 20 genes up-regulated after irradiation and containing the RDRM sequence in their promoter region were identified and described as part of the RDR regulon [22]. Most of them are involved in the metabolism of DNA. Two proteins, DdrO and IrrE, ensure the regulation of the RDR genes after DNA damage. DdrO is a negative transcriptional regulator that binds the RDRM sequence and represses the expression of the RDR genes [23–25]. IrrE is a metalloprotease [26] that cleaves, and thus inactivates DdrO after irradiation, leading to the transcriptional induction of the genes of the RDR regulon [23,24].

Here, we examined the *in vivo* and *in vitro* properties of the corrected DdrC protein to better understand its function in irradiated cells. We showed that the DdrC protein is induced after γ -irradiation in an IrrE/DdrO dependent manner and is rapidly recruited into the nucleoid of the irradiated cells. *In vitro*, the DdrC protein is able to bind single- and double-stranded DNA (dsDNA) with a preference for the single-stranded DNA (ssDNA). It condenses and protects DNA from nuclease attack, stimulates DNA single-strand annealing and promotes circularization of linearized plasmid DNA.

Taken together, our results show that DdrC is a new DNA binding protein with pleiotropic activities. DdrC might contribute to the repair of radiation induced DNA damage by limiting massive degradation of DNA and by maintaining DNA fragments end to end after exposure to high doses of UV or γ - radiation.

Material and methods

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions

Bacterial strains and plasmids are listed in [S1 Table](#). *Escherichia coli* strain DH5 α was used for cloning of *ddrC* in the pET26b expression vector. Recombinant DdrC-His₆ protein was expressed in the Rosetta2 (DE3) pLysS strain. All *D. radiodurans* strains were derivatives of the wild-type strain R1 ATCC 13939. To construct *D. radiodurans* deletion mutants or strains expressing a recombinant tagged protein, the loci of interest were replaced with the appropriate

antibiotic resistance cassette or their tagged counterparts, respectively, using the tripartite ligation method [27]. The oligonucleotides used for construction of all these strains are listed in S2 Table. The double mutants were constructed by transformation of a single mutant by the genomic DNA of another single mutant. Genomic DNA of *D. radiodurans* was purified and transformation of *D. radiodurans* with PCR products or genomic DNA was performed as previously described [8]. The genetic structure and the purity of mutant strains were verified by PCR. Oligonucleotides used for diagnostic PCR and sequencing are available upon request.

D. radiodurans bacteria were grown at 30°C in TGY2X (1% tryptone, 0.2% dextrose, 0.6% yeast extract) or plated on TGY1X containing 1.5% agar. *E. coli* bacteria were grown at 37°C in Luria Broth. Media were supplemented with the appropriate antibiotics used at the following concentrations: hygromycin, 50 µg/ml for *D. radiodurans*; chloramphenicol, 35 µg/ml for *E. coli* and 3.5 µg/ml for *D. radiodurans*; kanamycin, 30 µg/ml for *E. coli* and 6 µg/ml for *D. radiodurans*; and spectinomycin, 75 µg/ml for *D. radiodurans*.

UV-irradiation of *D. radiodurans* bacteria

UV-sensitivity of *D. radiodurans* bacteria was tested on plates. For this purpose, cultures of exponentially growing cells at $A_{650\text{nm}} = 0.3$ were serially diluted 1:10 in TGY2X broth and aliquots (10 µl) of each dilution were spotted on TGY1X agar plates. The plates were exposed to different doses of UV-radiation using a UV-C lamp emitting at a calibrated dose rate of $3.5 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and incubated at 30°C for 3–5 days.

γ-irradiation of *D. radiodurans* bacteria

A saturated pre-culture was diluted in fresh TGY2X medium and incubated at 30°C to an $A_{650\text{nm}} = 0.3$. Cells were then concentrated to $A_{650\text{nm}} = 20$ and exposed to 5 kGy γ-irradiation on ice (^{137}Cs irradiation system GSR-D1, dose rate 18.5 Gy/min, Institut Curie, Orsay). Following irradiation, cells were diluted 100 X in a TGY2X fresh medium and grown at 30°C with shaking. Samples were taken for analysis before irradiation and at the indicated time points after irradiation.

Western blot analysis of HA-tagged DdrC protein

Non-irradiated or irradiated cultures (5 kGy) of bacteria producing the DdrC-HA protein were diluted in 120 ml TGY2X broth to an $A_{650\text{nm}} = 0.2$ and incubated at 30°C with shaking. Aliquots of 15 ml were taken at different times and centrifuged at 4000 rpm and 4°C. The pellets were resuspended in 150 µl 1X SSC buffer (150 mM NaCl, 15 mM trisodium citrate, pH 7) and cell extracts were prepared as previously described [28]. Proteins from the supernatants were quantified by Bradford assays and 5 µg of crude extracts were resolved on 12% SDS-PAGE gels and transferred onto a PVDF membrane (GE Healthcare). The membrane was incubated overnight at 4°C with a 1:5000 dilution of monoclonal mouse anti-HA antibodies (Eurogentec), and then 1 h at room temperature with a secondary alkaline phosphatase-labeled anti-mouse antibody and revealed by a colorimetric reaction using nitroblue tetrazolium (NBT) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) as substrates for the alkaline phosphatase (Promega).

DdrO depletion

GY16917 ($\Delta\text{drrO}/\text{prepU}_{T_8}::\text{drrO}^+$) were grown at a permissive temperature (30°C) in TGY2X medium supplemented with chloramphenicol and spectinomycin. Cultures at $A_{650} = 0.3$ were centrifuged and pellets were resuspended in the same volume of fresh culture medium

supplemented with chloramphenicol. Then, cells were grown at permissive (30°C) or non-permissive (37°C) temperature for the replication of the *prepU_{T3}::ddrO+* plasmid. Aliquots of 20 ml were taken for Western blot analyses after 8 h, 16 h and 24 h incubation.

Localization of GFP-tagged or Cherry-tagged DdrC protein in living cells

The genes coding for GFP and Cherry used in this study, *drGFP* and *drCherry*, are optimized for expression in *D. radiodurans* [29]. Non-irradiated or irradiated cultures (5 kGy) of cells producing the DdrC-GFP or the DdrC-Cherry proteins were diluted in 10 ml TGY2X to an $A_{650\text{nm}} = 0.2$ and incubated at 30°C with shaking. Aliquots of 500 µl were taken at different times after irradiation and DAPI (2 µg/ml) was added before incubation at room temperature for 5 min. 2 µl of the cell suspension were then immobilized onto 1% agarose coated slides and observed by fluorescence microscopy on a wide-field Leica DM RXA microscope. Images were captured with a CDD camera [5 MHz Micromax 1300Y (Roper Instruments)] equipped with DAPI, GFP and Cherry appropriate filters, and were analyzed with Metamorph and ImageJ softwares.

Cloning of *ddrC* in an expression vector and protein purification

The *ddrC* coding sequence was PCR-amplified from *D. radiodurans* genomic DNA using two primers, DdrC-Nde and DdrC-Xho (S2 Table), and the amplified DNA fragment was cut by *NdeI* and *XhoI* before cloning into pET26b at the same restriction sites. The resulting plasmid (pET26-*ddrC*) expresses a recombinant DdrC protein fused to a 6His-tag at the C-terminal part of the protein. The DNA sequence of the fused *ddrC* gene was verified.

The pET26-*ddrC* plasmid was used to transform *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS cells. Transformed cells were grown at 37°C in LB medium supplemented with appropriate antibiotics to $A_{650\text{nm}} = 0.5$. After induction of the *ddrC-6his* gene expression by 1 mM IPTG during 3 h 30 at 37°C, cells were harvested by centrifugation and the DdrC-6His protein was then purified as previously described by Devigne *et al* [14] for the purification of the GyrA-6His protein.

Cross-linking of DdrC

DdrC was incubated with 0.1% glutaraldehyde in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7) at 30°C for 30 min in a final volume of 20 µl. After incubation, 5 µl of 5X Laemmli buffer (312.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 50% glycerol, 10% SDS, 250 mM DTT, 0.1% bromophenol blue) were added and the samples were analyzed by electrophoresis on 15% SDS-polyacrylamide gel followed by Coomassie blue staining.

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

200 ng of supercoiled pBR322 or pBR322 linearized by *PstI* (Thermo-Scientific) (4361 bp), as well as 200 ng of RFI (5386 bp) or single-stranded DNA of phiX174 virion were incubated in 20 µl of buffer A (40 mM Tris-HCl pH 7.8, 5 mM MgCl₂, 1.5 mM DTT, 50 mM NaCl, 12% glycerol) with increasing concentrations of DdrC (0.86 µM, 1.7 µM, 3.5 µM, 7 µM and 8.6 µM). After 15 min incubation at 4°C, 4 µl of 6X DNA Loading Dye (Fermentas) were added to the mixture before electrophoresis through 1.2% agarose gels. All the non-denaturing electrophoreses were performed in TEP buffer (36 mM Tris-HCl, pH 7.8, 30 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA) at 4.3V/cm for 3 h at 4°C. After staining of the gels with ethidium bromide (1 µg/ml) for 30 min, bands were visualized under UV, using Image Lab (Bio-Rad) software. Binding of DdrC protein to oligonucleotides was performed using a single-stranded 67-mer Cy5 labeled oligonucleotide (oligo-67) or the corresponding double-stranded 67-mer substrate. To

produce the ds 67-mer substrate, 1 pmole of oligo-67 and oligo-67 rev were mixed together in a buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl), heated at 95°C for 2 min, and cooled for 2 h at room temperature. The sequence of the 67-mer was arbitrary selected from the M13 phage genome. The sequences for oligo-67 and oligo-67 rev are: 5' CTGTTTAAGAAATTCACCTCGA AAGCAAGCTGATAAACCGATACAATTAAGG-CTCCTTTTGGAGCC-3' and 5' -GGCTCCAA AAGGAGCCTTTAATTGTA-TCGGTTTATCAGCTTGCTTTTCGAGGTGAATTTCTTAAACAG-3', respectively. All reactions were performed in 15 µl of buffer A containing 50 fmoles (3.3 nM) of DNA and increasing concentrations of DdrC (20 nM, 40 nM, 80 nM, 175 nM, 350 nM, 700 nM, 1.4 µM, 2.8 µM). Complexes were separated on 6% (w/v) native polyacrylamide gels (19:1 (w/w) acrylamide/bisacrylamide) in 0.25 X TBE buffer (Tris/Borate/EDTA) containing 10% glycerol. The gels were prerun before loading the reaction mixtures. After migration at 15 V/cm for 135 min at 4°C, bands were visualized by scanning with a Typhoon phosphorimager (Typhoon Trio Imager, GE Healthcare).

DNA protection assays

The ability of DdrC to protect DNA from digestion by nucleases was assessed on different DNA substrates (supercoiled and linear pBR322, phiX174 single-stranded DNA). Nuclease protection of supercoiled pBR322, linear pBR322 (cut by *EcoRV*) or ss phiX174 virion was tested with 0.1 U DNase I (Promega), 200 U Exonuclease III (NEB) or 1 U Mung Bean Nuclease (Promega), respectively. 200 ng of ds circular DNA, linear plasmid DNA or ss circular DNA were pre-incubated for 15 min at 4°C in the absence or the presence of DdrC (7 µM, 7 µM, and 2 µM, respectively) in 20 µl of buffer A. 2 µl of the respective 10 X nuclease buffer provided by the manufacturer, and nuclease were then added and the samples were incubated at 30°C for 5 min for DNase I, 30 min for Exonuclease III or 15 min for Mung Bean Nuclease. As a control, 200 ng of ds circular pBR322 DNA was incubated simultaneously with 7 µM DdrC and 0.1 U DNase I. After addition of loading buffer, samples were immediately applied onto 1.2% agarose gels. Electrophoreses were performed in TEP 1X buffer at 4.3 V/cm for 3 h at 4°C.

DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) fluorescence-based annealing assay

The annealing assay was based on the method described in Kantake *et al* [30]. Briefly, 200 nM of a 67-mer oligonucleotide (oligo-67) were mixed with 0.2 µM DdrC protein, or 0.1 µM T4gp32 (New England Biolabs), or 0.1 µM *E. coli* SSB (Sigma), respectively, in 1 ml of a reaction buffer (30 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT) containing 0.2 µM DAPI (Thermo Fisher). Reactions were started by addition of the reverse oligonucleotide (oligo-67 rev). The annealing of complementary oligonucleotides was monitored by a Shimadzu RF 6000 spectrofluorometer with excitation and emission wavelengths at 345 and 467 nm using banding of 5 and 10 nm, respectively.

Effect of DdrC on T4 DNA ligase activity

200 ng of purified pBR322 DNA molecules digested by *PstI* (Thermo-Scientific) were pre-incubated at 4°C for 15 min in the absence or the presence of increasing concentrations of DdrC protein (0.1 µM, 0.2 µM, 1 µM, 2 µM and 4 µM) prior to addition of T4 DNA ligase (Thermo-Scientific). The reactions were stopped after 15 min at 30°C by addition of a mix of Proteinase K (1 mg/ml) and SDS (0.5%) (10 min at 37°C) and samples were loaded on a 1% agarose gel.

Transmission electron microscopy (TEM) analysis

PhiX174 single-stranded DNA (ssDNA) (1.4 nM) (New England Biolabs), or supercoiled double-stranded (dsDNA) pBR322 (1.7 nM) (New England Biolabs) was incubated for 30 min at 30°C with DdrC at various concentrations (0.5 μM, 1 μM, or 2 μM) in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl. PhiX174 ssDNA covered with *E. coli* Single Strand DNA Binding Protein (SSB, 1 μM) (Sigma) was used as control. To analyze interaction of DdrC with linear DNA fragment, pUC19 plasmid (New England Biolabs) was linearized with *SspI* (New England Biolabs) restriction enzyme producing blunt ends and pBR322 plasmid was linearized with *PstI* (New England Biolabs) producing 3' overhang cohesive ends. For TEM experiments, all DNA molecules were purified on a MiniQ anion exchange column (GE Healthcare) with a chromatography SMART system. The purified DNA was precipitated and resuspended in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA buffer. DdrC at 0.5 μM or 1 μM was mixed with 2 nM molecule of linear pUC19 DNA fragment or/and pBR322, containing, respectively, blunt and cohesive ends. Nucleoprotein complexes were directly analyzed by TEM. Sample preparations were performed by positive staining, as previously described [31]. Five μl of DNA-protein reaction were deposited onto a 600 mesh copper grid coated with a thin carbon film, previously activated by glow-discharge in the presence of pentylamin (Merck, France). After 1 min, grids were washed with aqueous 2% (w/v) uranyl acetate (Merck, France) and then dried with ashless filter paper (VWR, France). Observations were carried out on a Zeiss 902 transmission electron microscope in filtered annular dark field mode. Electron micrographs were obtained using a Veletta digital camera and the iTEM software (Olympus, Soft Imaging Solutions).

Results

Deletion of *ddrC* significantly decreases the UV resistance of $\Delta uvsE$ mutant

No obvious phenotype was previously described associated with a single *dr0003* locus deletion also resulting in the inactivation of the correctly annotated *ddrC* gene. Here, we show that a single $\Delta ddrC$ mutant was reproducibly about 10-fold more UV-sensitive than wild-type cells when exposed to high UV-doses, such as 750 J m⁻² (Fig 1A). Thus, we tested if the DdrC protein is involved in DNA repair of UV-lesions through UvrABC dependent nucleotide excision repair or UVDE repair pathways [32]. For this purpose, a *ddrC* deletion was combined with an *uvrA1* (*dr1771*) or a *uvsE* (*dr1819*) deletion and we measured survival of the resulting strains after exposure to increasing doses of UV-radiation. Strikingly, the absence of the DdrC protein significantly increased UV-sensitivity of a single $\Delta uvsE$ mutant. Indeed, when exposed to a dose of 500 J m⁻² UV-radiation, the double mutant $\Delta ddrC \Delta uvsE$ is approximately 50-fold more sensitive than the $\Delta uvsE$ single mutant (Fig 1A). At the same dose, no effect of a *ddrC* deletion was observed on UV-sensitivity of the $\Delta uvrA$ mutant (Fig 1A). However, when the UV-dose increased to 750 J m⁻², $\Delta ddrC$, $\Delta uvrA$, and $\Delta uvsE$ single mutants were about 10, 100 and 1000 fold more UV-sensitive than the parent R1 strain respectively, and the $\Delta ddrC \Delta uvrA$ double mutant was approximately 10 fold more UV-sensitive than the $\Delta uvrA$ mutant (Fig 1A). The triple mutant $\Delta ddrC \Delta uvrA \Delta uvsE$ exhibited the same UV sensitivity as the double mutant $\Delta uvrA \Delta uvsE$ (Fig 1B).

It was previously shown that the *D. radiodurans* $\Delta recA$ mutant was more sensitive to UV radiation than the double mutant $\Delta uvrA \Delta uvsE$, suggesting that the recombinational repair is an essential pathway for replication fork restart in UV-damaged cells [33]. Thus, we analyzed the impact on survival of a *ddrC* deletion in a $\Delta recA$ mutant, but as shown in Fig 1C, the survival of double mutant $\Delta ddrC \Delta recA$ bacteria was identical to those of $\Delta recA$ mutant bacteria.

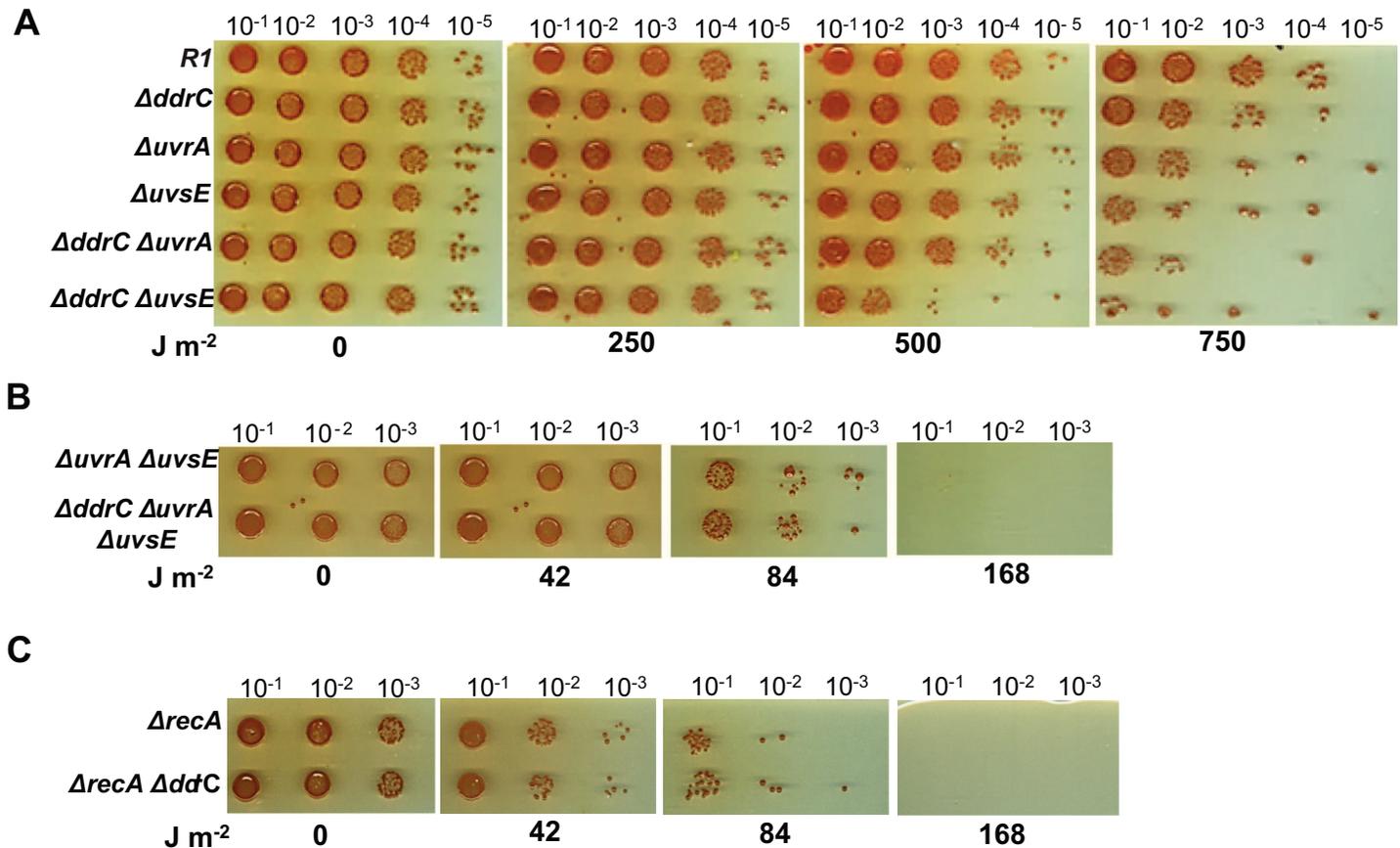


Fig 1. Absence of DdrC increases UV-sensitivity of cells devoid of the UvsE endonuclease. **A** Wild type (R1), $\Delta ddrC$ (GY 15929), $\Delta uvrA$ (GY 15971), $\Delta uvsE$ (GY 15972), $\Delta ddrC \Delta uvrA$ (GY 15973), $\Delta ddrC \Delta uvsE$ (GY 15974) mutant bacteria grown to an $A_{650nm} = 0.3$ were serially diluted in TGY2X broth and aliquots (10 μ l) of each dilution were spotted on TGY agar plates. Then, the plates were exposed to UV radiation at the indicated UV doses before incubation at 30°C for 3–5 days. **B** $\Delta uvrA \Delta uvsE$ (GY 15977) and $\Delta ddrC \Delta uvrA \Delta uvsE$ (GY 15978) and **C** $\Delta recA$ (GY 15180) and $\Delta recA \Delta ddcC$ (GY 15965) mutants were treated as described in Fig 1A. All experiments were performed at least 3 times.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177751.g001>

These results suggest that the DdrC protein might play a role in DNA repair of UV-damaged DNA.

The expression of the DdrC protein is induced after γ -irradiation in an IrrE- and DdrO-dependent manner

The newly annotated *A2G07_003810* gene [21], located on the opposite strand of *dr0003* [19], encodes a DdrC protein of 231 amino acids (deduced MW: 25.148 Da, IP: 10.8) (S1 Fig) that exhibits 70% identity with the *deide_23280 D. deserti* homolog. An RDRM sequence, found in the promoter regions of genes induced upon radiation/desiccation [22], was located 19 nt upstream the putative start codon of *A2G07_003810* [20]. Thus, we investigated the expression of a C-terminal HA-tagged DdrC protein after exposure of *D. radiodurans* cells to a dose of 5 kGy γ -irradiation and tested if it was under the control of the IrrE and DdrO regulatory proteins (Fig 2).

Western blot analyses (Fig 2A) showed that the DdrC-HA protein was expressed at an undetectable level under normal growth conditions, but accumulated early within the cells in response to radiation-induced DNA damage, with a maximum expression at 0.5–1 h after irradiation. In contrast, no signal was detected in the $\Delta irrE$ mutant (Fig 2B), suggesting that, in

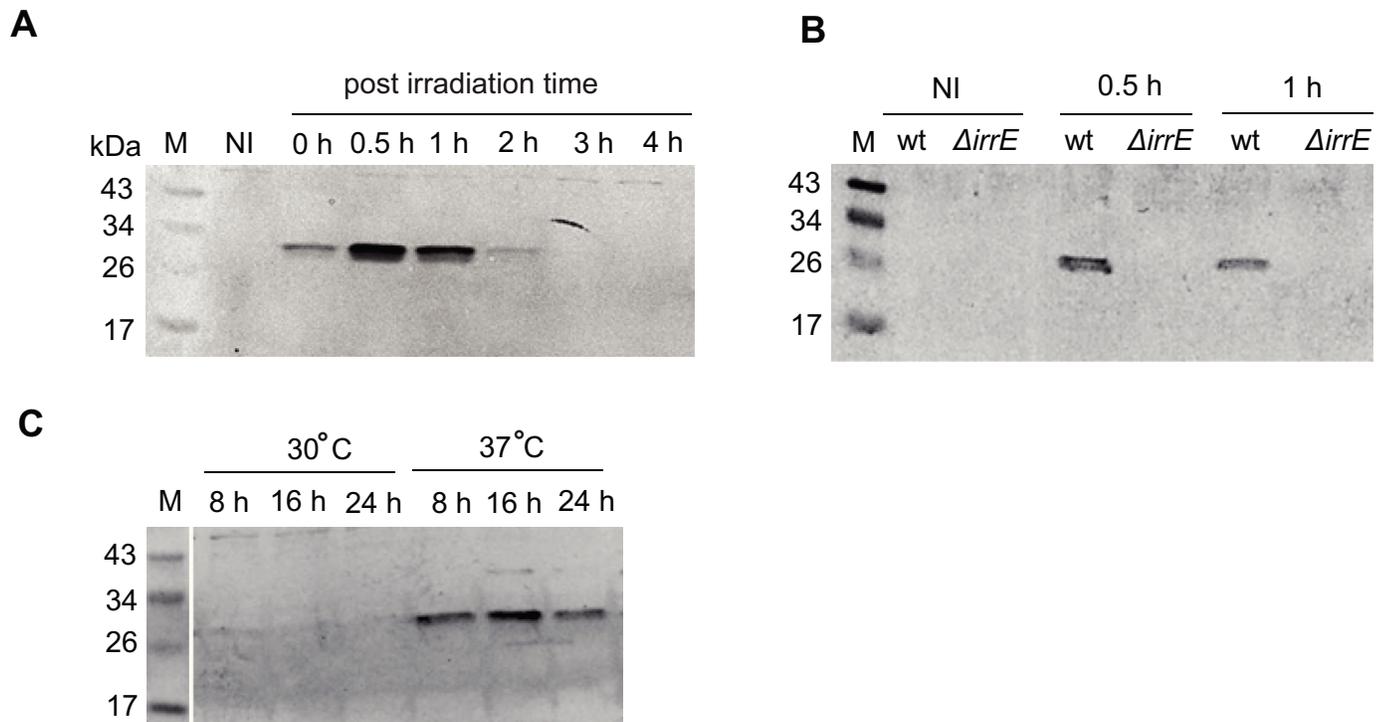


Fig 2. The expression of the DdrC protein was induced after exposure to γ -radiation in an IrrE and DdrO dependent manner. **A and B** GY15921: *ddrC::HA* (wt) and GY15967: *ddrC::HA* Δ *irrE* (Δ *irrE*) bacteria exposed or not to 5 kGy γ -radiation were diluted to an $A_{650nm} = 0.2$ and incubated at 30°C for the indicated periods (hours). Cell extracts were subjected to SDS-PAGE and analyzed by Western blot with anti-HA antibodies. 5 μ g of proteins were loaded on each well. Lane NI: non-irradiated cells. Lane 0 h: non-incubated irradiated cells. **C** GY16917: a [*ddrC::HA* Δ *ddrO* (*prepU_{Ts} ddrO*)] culture grown at 30°C in TGY2X broth supplemented with spectinomycin ($A_{650nm} = 0.3$) was divided into two identical vials and incubated at 30°C or at 37°C, respectively for the indicated periods (hours). Cell extracts were subjected to SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with anti-HA antibodies. Ten μ g of proteins were loaded on each well.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177751.g002>

vivo, IrrE is directly or indirectly involved in the induction of the DdrC expression in response to irradiation. We then tested whether the DdrO regulator controlled the expression of the DdrC protein. As shown in Fig 2C, depletion of the DdrO protein in cells expressing *ddrO* from a *prepU_{Ts}* plasmid and grown at 37°C, a non-permissive temperature for the replication of the plasmid, resulted in an increase of the cellular level of the DdrC-HA protein. Thus, the degradation of the DdrO regulator by the IrrE protease that occurred after irradiation [24] leads to the induction of the DdrC protein expression.

The DdrC protein is recruited to the nucleoid after exposure to γ -irradiation

To determine the cellular localization of the DdrC protein, we replace the *ddrC* gene by its *drGFP*- or *drCherry*-tagged counterpart. We first verified the functionality of the tagged proteins in cells devoid of the UvsE protein. As shown in S2 Fig, *ddrC::drGFP* Δ *uvsE* and *ddrC::drCherry* Δ *uvsE* bacteria were more resistant to UV than Δ *ddrC* Δ *uvsE* double mutant bacteria, suggesting that the tagged DdrC-GFP or DdrC-Cherry proteins remained functional. Then, we determined the cellular localization of the tagged DdrC proteins by fluorescence microscopy at different times after exposure to a dose of 5 kGy γ -irradiation.

Interestingly, the GFP-tagged DdrC protein was transiently associated with the nucleoid in more than 90% of the observed cells after a 0.5 h (199/200) and 1 h (182/201) postirradiation incubation (Fig 3). The proportion of fluorescent cells dropped to 42% (88/208) at 2 h. The

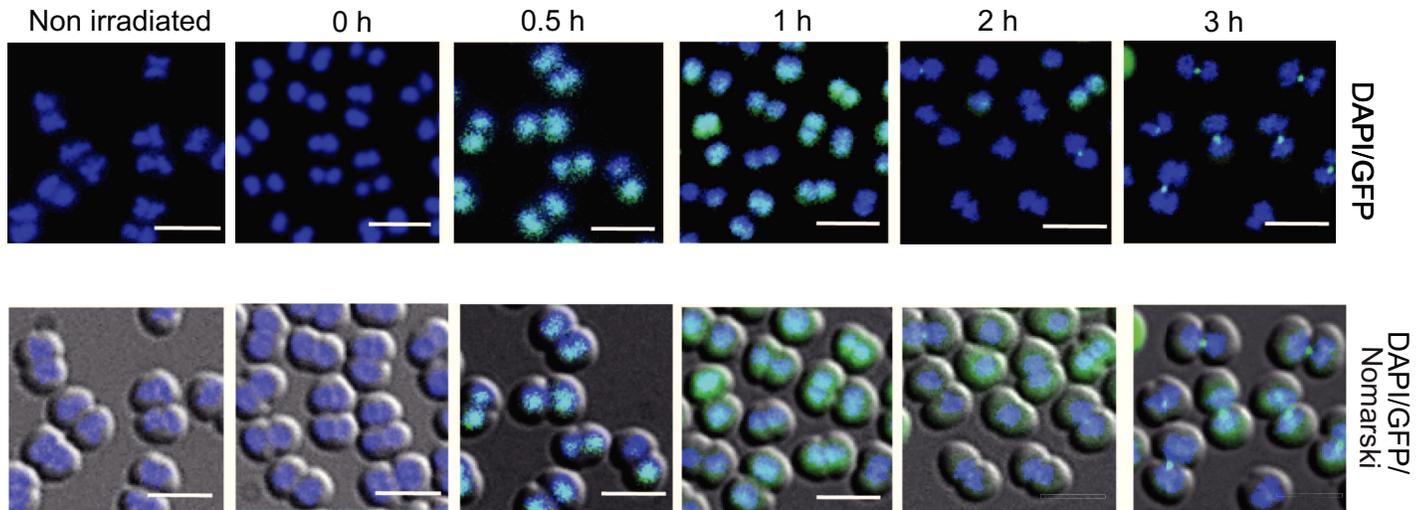


Fig 3. Cellular localization of DdrC-GFP after γ -irradiation of *D. radiodurans* cells. Bacteria expressing a DdrC-GFP fusion protein (GY15931) recovering from γ -irradiation (5 kGy) were visualized by fluorescence microscopy at the indicated times of post-irradiation incubation. DNA was stained with DAPI. Overlays of GFP (green) and DAPI (blue) images as well as overlays of Nomarski DIC (grey), GFP and DAPI are shown.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177751.g003>

localization of the DdrC protein changed with time with foci at the septum of dividing cells observed in 24% and 68% of cells after 2 h and 3 h post irradiation incubation, respectively. We observed the same patterns of fluorescence in cells expressing a C-terminal Cherry-tagged DdrC protein (S3 Fig). These data suggest that DdrC protein might interact with damaged DNA after irradiation.

DdrC exists both as a monomer and a dimer in solution

In order to investigate the biochemical properties of the DdrC protein, the correct *ddrC* gene was cloned in the pET26b *E. coli* expression vector with a C-terminal 6X His-tag. As seen in SDS-PAGE analysis, the purified recombinant protein was found to have an approximate MW of 26 kDa (Fig 4) correlating with the deduced amino acid sequence (26.2 kDa) and we verified that the recombinant protein was functional *in vivo* (S2 Fig). Using glutaraldehyde as a crosslinking agent, an intense band migrating at about 50 kDa was observed on the SDS PAGE gel, likely corresponding to the dimeric form of DdrC. Thus, DdrC was mainly present both in monomeric and dimeric forms in solution, even if several faint bands attributed to multimeric forms of DdrC were visible after glutaraldehyde treatment when the DdrC amount was > 2.7 μ g.

DdrC binds to DNA *in vitro* with a preference for ssDNA

Since DdrC is recruited onto the nucleoid after irradiation, we investigated by EMSA assay the ability of His₆-tagged DdrC proteins to bind DNA *in vitro*. DdrC induced a total DNA shift when 3.5 μ M of protein was incubated with negatively supercoiled pBR322 plasmid DNA (Fig 5A). At higher concentrations, DdrC binding resulted in large DNA-protein complexes. The treatment of these nucleoprotein complexes with proteinase K and SDS released intact DNA, indicating that the DNA had not undergone any covalent modification (Fig 5A, left panel, lane 6).

The DNA shift promoted by DdrC was also observed with linear pBR322 DNA and with supercoiled phiX174 dsDNA (RFI) (Fig 5A) showing no preference for the different topological forms of DNA. However, when the single-stranded DNA form of phiX174 (phiX174 ssDNA) was used as a substrate, a complete shift was visible at 1.7 μ M of the DdrC protein,

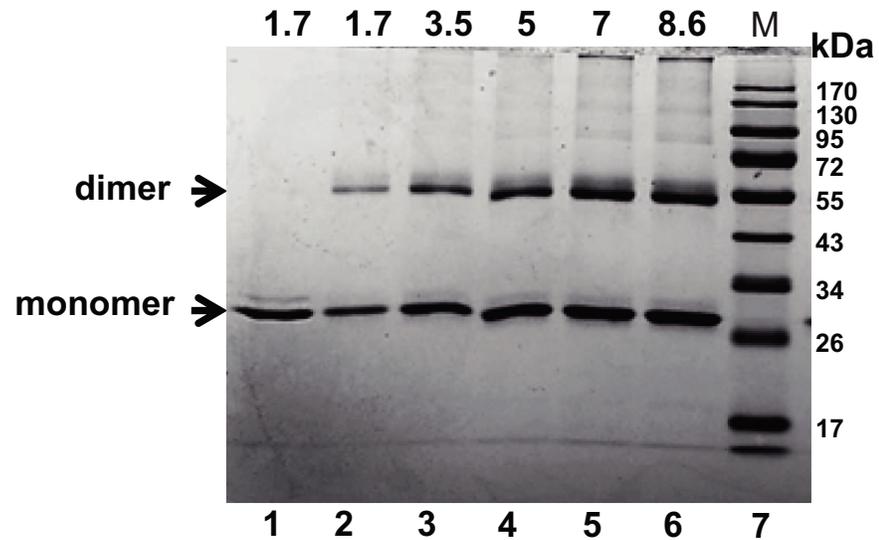


Fig 4. Dimerization of DdrC in solution. Lane 1: Purified recombinant DdrC-His₆ protein. Lanes 2–6: Increasing concentrations of recombinant DdrC protein (μM) crosslinked with glutaraldehyde. Lane 7: Molecular weight markers (kDa).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177751.g004>

while at this protein concentration a band corresponding to the unbound dsDNA substrate (RFI form) was still visible.

This greater affinity for ssDNA than for dsDNA was further analyzed by comparing the binding of DdrC to ss and ds 67-mer oligonucleotides (Fig 5B). A discrete band corresponding to ssDNA-DdrC complex appeared at 40 nM DdrC, while no band shift was observed with dsDNA at the same DdrC concentration. Finally, we showed that DdrC also binds with the same efficiency to 81-mer oligonucleotides containing a G+C percentage of 37% or 65.4% (S4 Fig). Taken together, these results suggest that DdrC protein exhibits a preference for the ssDNA substrate without sequence specificity.

DdrC protects DNA from degradation by nucleases

Then, we investigated the DdrC ability to protect DNA from nucleases. DdrC was incubated with different DNA substrates prior to the addition of endo- or exo-nucleases (Fig 6). Whereas massive DNA degradation was observed in the absence of DdrC (Fig 6, lanes 1 of panels a, b, c), the presence of DdrC substantially protected supercoiled pBR322, linear pBR322 and closed circular ssDNA from degradation by DNase I endonuclease, exonuclease III and Mung Bean endonuclease, respectively (Fig 6, lanes 3 of panels a, b and c). A further treatment with proteinase K and SDS released intact DNA substrate molecules (Fig 6, lanes 4 of panels a, b and c). Interestingly, when DdrC and the DNase I are simultaneously added to the supercoiled pBR322 plasmid, the products were similar to those observed when DNA was preincubated with the DdrC protein (Fig 6, lane 5 of panel a) suggesting that DdrC binds rapidly to DNA and impedes access of DNase I to DNA, thus preserving DNA from degradation.

DdrC stimulates annealing of complementary DNA strands

As DdrC preferentially binds ssDNA (Fig 5), we also tested if DdrC promotes DNA strand annealing. For this purpose, we examined the annealing of two complementary 67-mer oligonucleotides in presence or absence of DdrC using a DAPI fluorescence-based method [30]. In

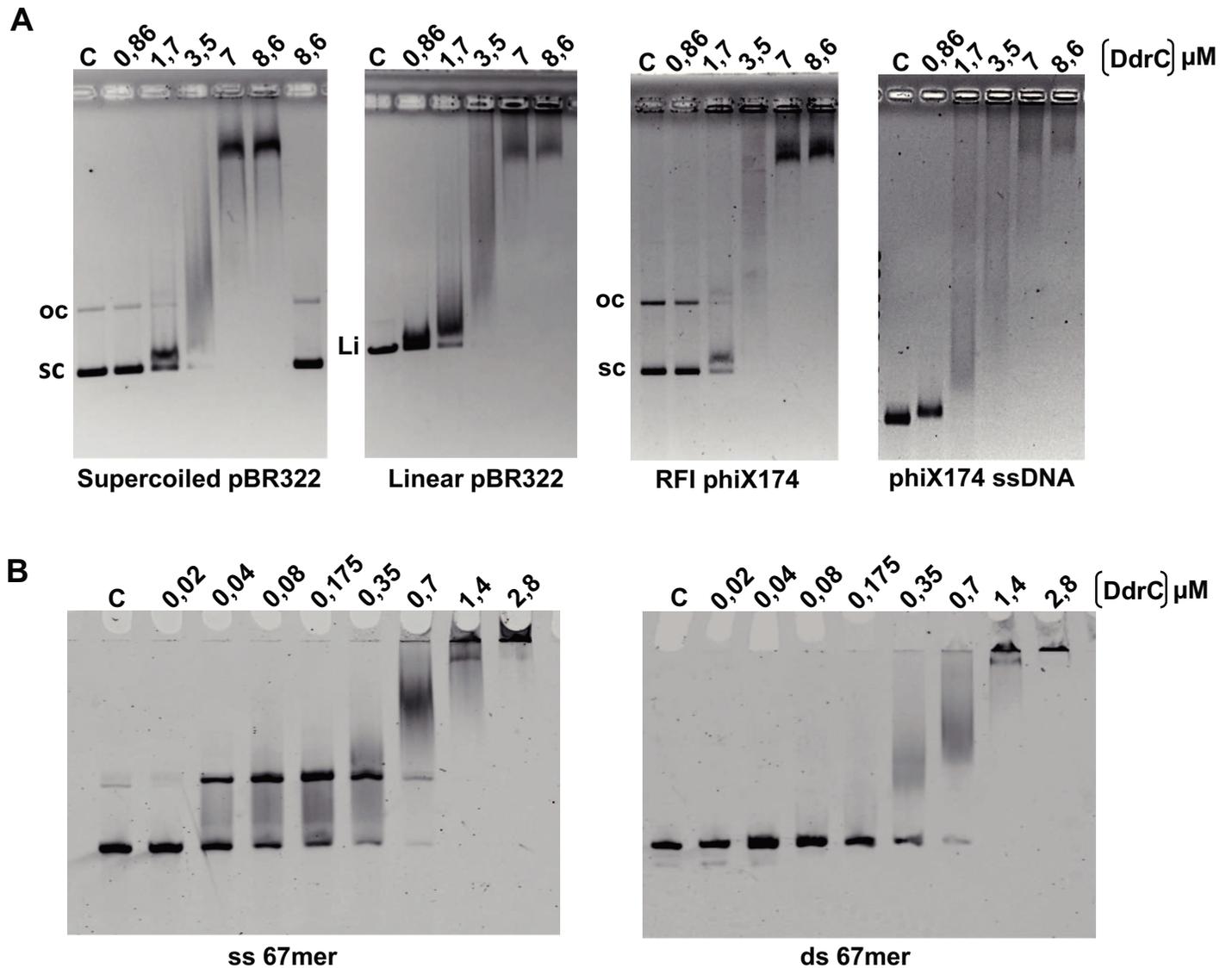


Fig 5. DdrC binds to ssDNA and dsDNA with a preference for ssDNA. **A** Binding of recombinant DdrC to plasmid or viral DNA analyzed by EMSA. 200 ng of supercoiled or linear pBR322 DNA as well as 200 ng of RFI or single-stranded DNA of phiX174 virion (31 μM nucleotides of each DNA) were incubated with increasing concentrations of DdrC as indicated in the figure. DNA-protein complexes were separated in 1.2% agarose gels. Products loaded in the right lane of the left panel were treated with SDS and proteinase K. sc: supercoiled dsDNA, oc: open circle dsDNA, Li: linear dsDNA. **B** Binding of DdrC to oligonucleotides. Increasing concentrations of DdrC were incubated with 3.3 nM of a single-stranded (ss) 67-mer fluorescent oligonucleotide (left panel) or 3.3 nM of the corresponding ds oligonucleotide (right panel). The products of the reactions were separated in 6% native polyacrylamide gels. Lanes C: DNA control without DdrC.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177751.g005>

the absence of any protein, only a few spontaneous annealings occurred over time, resulting in a very slow increase of dsDNA-specific DAPI fluorescence (Fig 7, without protein). As a control, we also verified that *E. coli* SSB protein did not stimulate the formation of DNA duplex (Fig 7, SSB). In contrast, when DdrC protein was mixed with the 67-mer oligonucleotide, addition of the complementary oligonucleotide resulted in a rapid increase in DAPI fluorescence (Fig 7, DdrC), as observed with the T4gp32 protein known to stimulate efficiently DNA annealing [30] (Fig 7, T4gp32). Thus, we conclude that the DdrC protein exhibits a single-strand annealing activity.

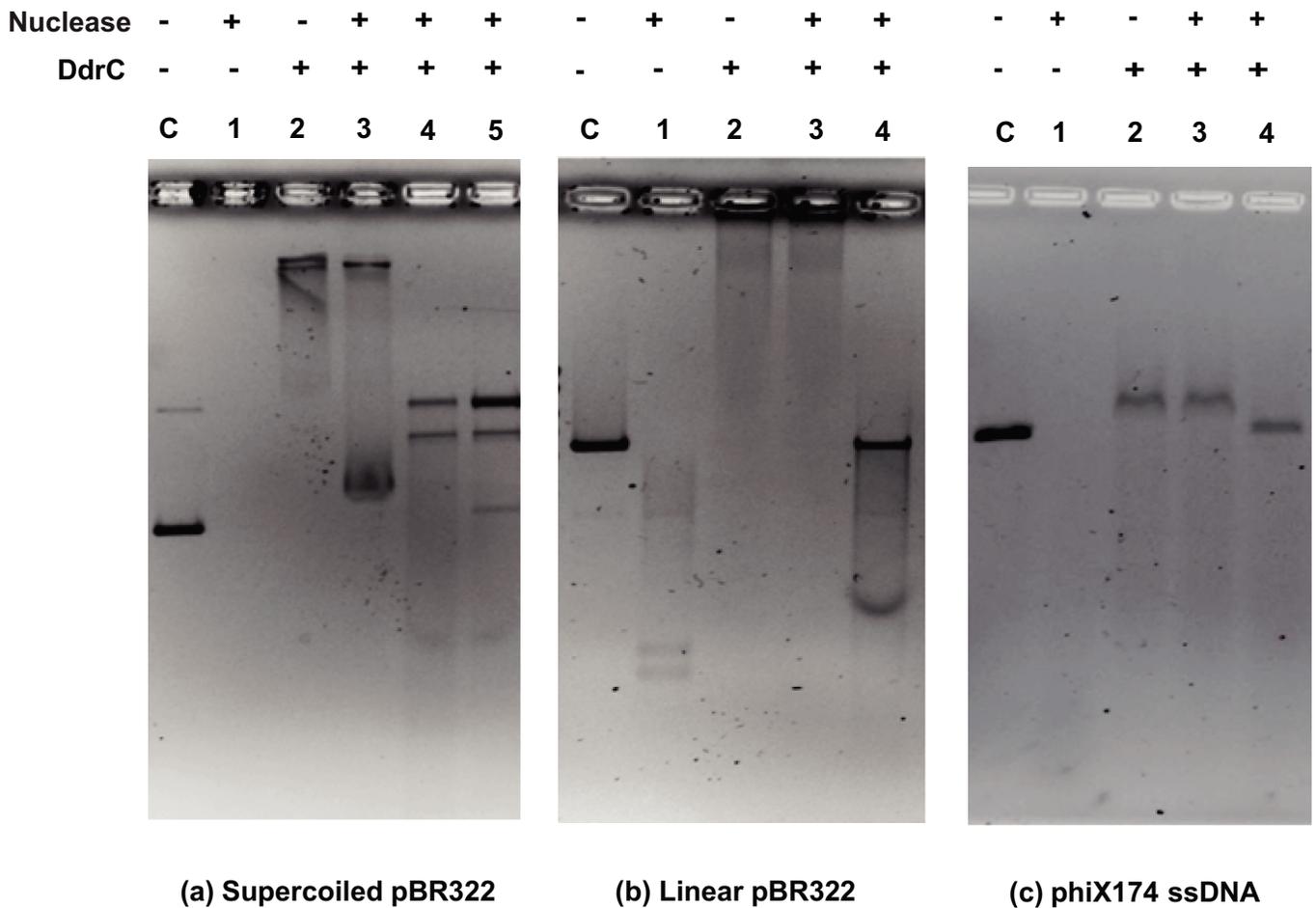


Fig 6. DdrC protects DNA against degradation by nucleases. Protection of supercoiled pBR322 plasmid (3.5 nM) from DNase I activity (0.1 U) (panel a), linear pBR322 (3.5 nM) from Exonuclease III activity (200 U) (panel b) and phiX174 ssDNA (5.9 nM) from Mung Bean Nuclease activity (1 U) (panel c) by 7 μ M, 7 μ M, and 2 μ M DdrC, respectively. Lanes C: DNA controls without protein. Lanes 1: DNA incubation with nuclease alone. Lanes 2: DNA incubation with DdrC alone. Lanes 3: DNA pre-incubated with DdrC 15 min at 4°C before addition of nuclease. Lanes 4: Reaction products corresponding to lane 3 were further treated with Proteinase K/SDS. Panel a, lane 5: DdrC and DNase I were simultaneously incubated with supercoiled DNA before treatment with Proteinase K/SDS.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177751.g006>

DdrC condenses DNA *in vitro*

To further investigate DdrC-DNA interactions, transmission electronic microscopy (TEM) was performed with various DNA substrates (circular phiX174 ssDNA, supercoiled pBR322 dsDNA) (Fig 8). As shown in Fig 8A (panel e), the *E. coli* SSB protein, at a 1:7.5 protein / nucleotide ratio, coats and stretches ssDNA in the “*E. coli* SSB₃₅” binding mode, removing the DNA secondary structures as previously described [34]. At the same ratio, DdrC interacted with ssDNA and slightly compacted it (Fig 8A, panels b, c, d). At a higher protein concentration (1:3.75 ratio), highly compacted structures were observed (Fig 8A, panels f, g, h) suggesting protein-protein interactions resulting in a tangled network of DdrC-DNA complexes. When DdrC was incubated with negatively supercoiled pBR322 DNA, “bridge” structures were observable, leading to the formation of loops or kink-like structures (Fig 8B, panels b to d). Relaxed forms were observed at a 1:7.5 protein / base pair ratio (Fig 8B, panels b and c) while at higher DdrC concentration (1:3.75 protein / nucleotide ratio), condensed forms were visible (Fig 8B, panel d).

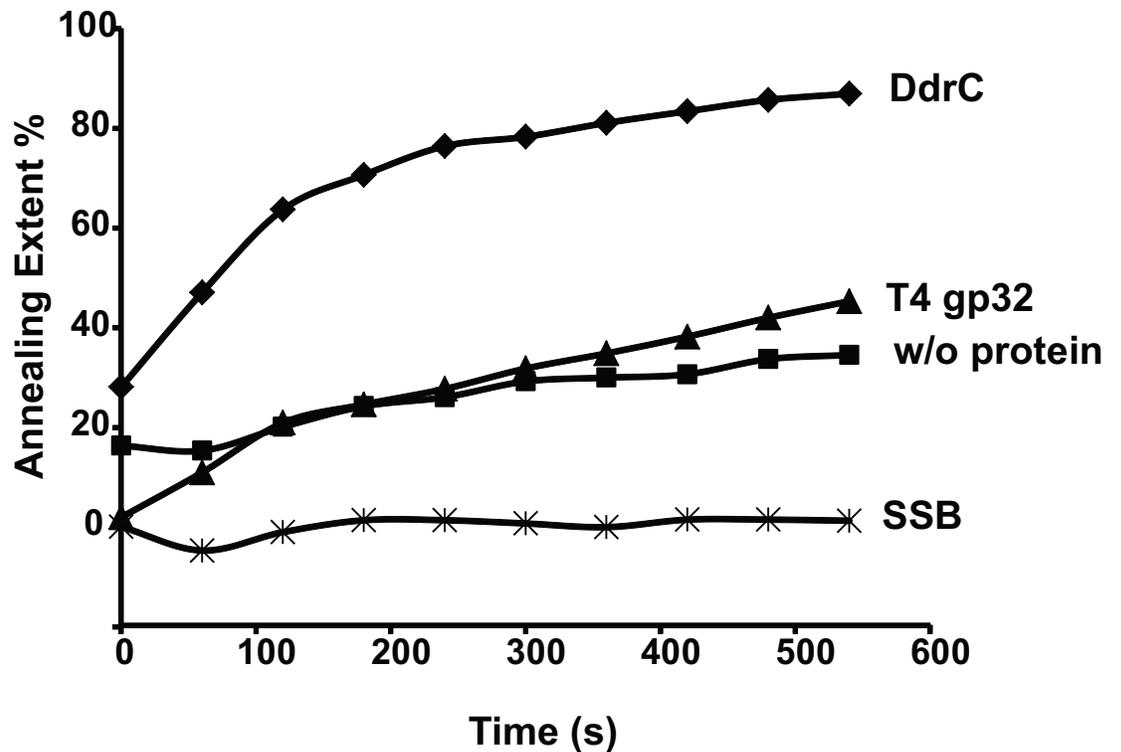


Fig 7. DdrC stimulates DNA annealing. Kinetics of two complementary 67-mer oligonucleotides annealing in the absence (w/o protein) or the presence of DdrC, T4 gp32 or SSB using a DAPI fluorescence-based method. The 67-mer oligonucleotide (200 nM) was mixed in 1 ml of reaction buffer with 0.2 μ M DdrC protein, or 0.1 μ M T4 gp32, or 0.1 μ M SSB from *E. coli* prior to addition of the reverse oligonucleotide. The extent of DNA annealing is defined as follows: (observed fluorescence—67-mer ssDNA fluorescence) x 100 / 67-mer dsDNA fluorescence.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177751.g007>

DdrC protein promotes circularization of linear plasmid DNA

TEM was also performed with linearized pBR322 and pUC19 plasmids with cohesive and blunt ends, respectively (Fig 9). Strikingly, when DdrC was incubated with linear plasmids containing cohesive or blunt ends, circularized DNA were observed, showing that the DdrC protein was able to join the both DNA ends (Fig 9 panels b-e) for pBR322 and panels g-j for pUC19). Various events were also detected such as loops or kink-like structures related to the ability of DdrC to bridge DNA (Fig 9) as we observed in Fig 8. However, we cannot assert that the positions of the kinks observed in Fig 9 coincide with the loci of plasmid circularization. The percentage of plasmid circularization observed for linear pBR322 containing cohesive ends was 28%, 52% and 84% at 0.5 μ M, 1 μ M and 2 μ M DdrC concentrations, respectively. When linear pUC19 plasmid containing blunt ends was incubated with DdrC at the same concentrations, similar percentages of circularized DNA were found (24%, 47%, and 78%, respectively). Each observation was carried out with a set of 300 molecules.

Since DdrC was able to circularize linear DNA molecules (Fig 8), we tested whether DdrC could stimulate DNA ligation activity as does *D. radiodurans* PprA protein [13]. We found that DdrC protein did not stimulate ligation of pBR322 digested with *Pst*I when incubated with different concentrations of T4 DNA ligase (S5 Fig). T4 DNA ligase activity appeared to be inhibited when DdrC was added at concentrations > 1 μ M (S5 Fig) suggesting that DdrC might prevent access of the ligase to DNA.

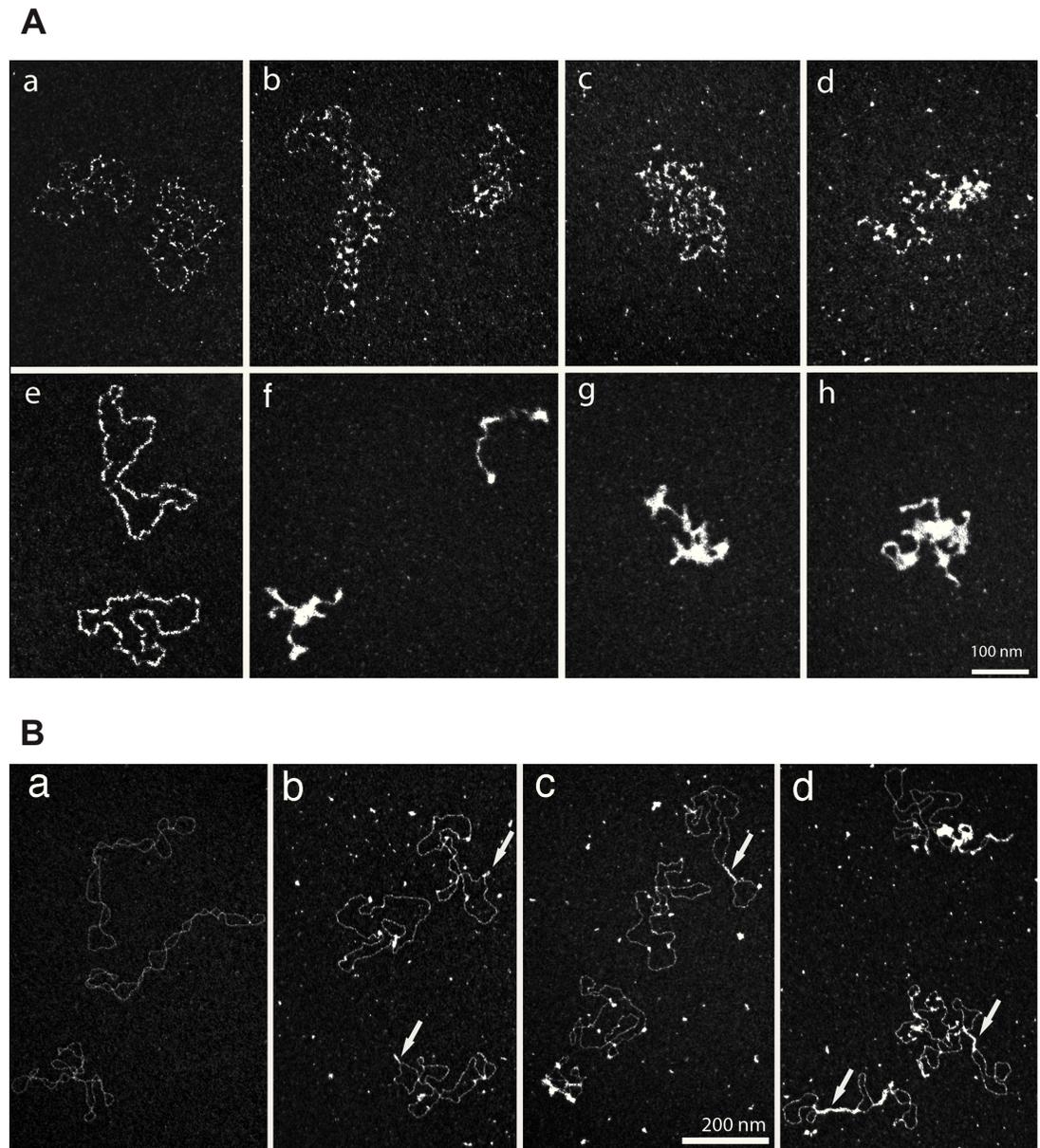


Fig 8. Visualization of DdrC-DNA complexes by transmission electron microscopy. **A** PhiX174 ssDNA (1.4 nM, 7.5 μ M nucleotides) was incubated with 1 μ M (panels b-d) or 2 μ M (panels f-h) of DdrC. Panel a: phiX174 ssDNA control without DdrC. Panel e: Interaction of *E. coli* SSB protein (1 μ M) with ssDNA. Magnification = 85,000. **B** Supercoiled pBR322 DNA (1.7 nM, 7.5 μ M base pairs) incubated with 1 μ M (panel b and c) or 2 μ M (panel d) of DdrC. Panel a: pBR322 DNA control without protein. Magnification = 85,000. Some "bridge" structures, forming loops or kinks, are indicated by arrows.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177751.g008>

Discussion

The *D. radiodurans* bacterium possesses an exceptional ability to tolerate massive DNA damage generated by exposure to high doses of UV or γ -radiation. It was previously shown that some genes specific to the *Deinococcaceae*, including *ddrA*, *pprA* and *ddrB*, are highly induced after irradiation and involved in radioresistance [7]. In contrast, no obvious phenotype was associated, to date, with the single deletion of the *ddrC* (*dr0003*) gene that yet was shown to be

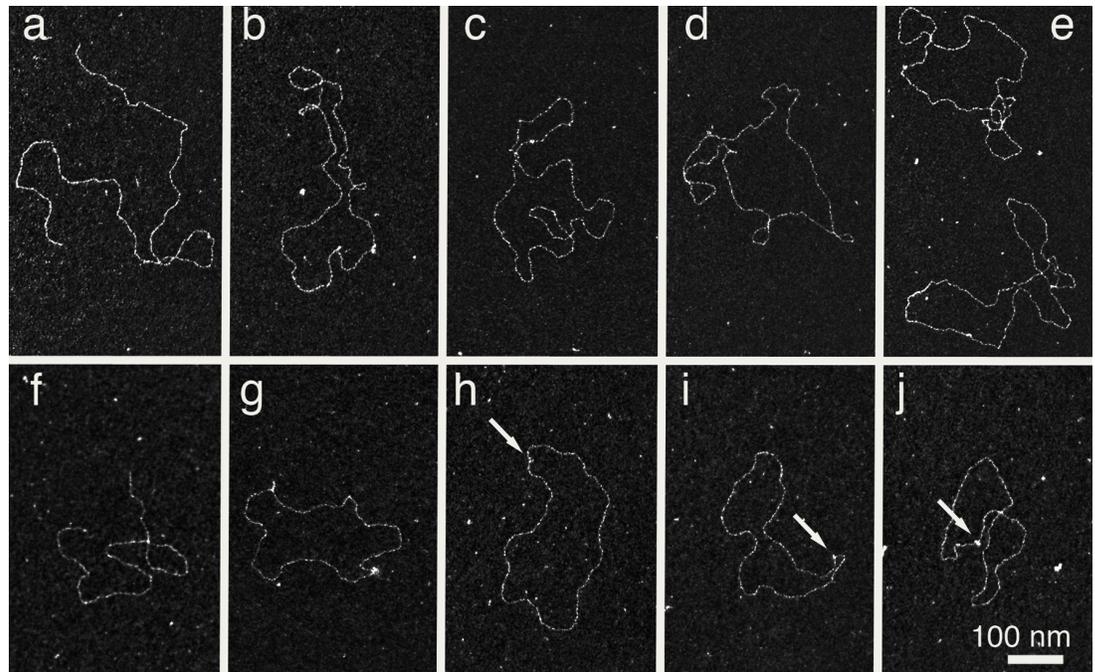


Fig 9. Circularization of pBR322 (cohesive ends) and pUC19 (blunt ends) plasmids mediated by DdrC visualized by electron microscopy. Panel a: Control pBR322 DNA linearized by PstI. Panels b-e: pBR322 circularization mediated by DdrC. Panel f: Control pUC19 DNA linearized by Ssp11. Panels g-j: pUC19 circularization mediated by DdrC. 1 μ M DdrC was mixed with 2 nM molecules of linear pBR322 or pUC19 plasmid, containing cohesive or blunt ends, respectively. The shapes are similar at 0.5 μ M, 1 μ M or 2 μ M of DdrC. Magnification = 85,000. Some loci of plasmid circularization are indicated by arrows.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177751.g009>

induced 12-fold when cells were exposed to 3 kGy γ -radiation [7]. More recently, it was proposed that the orientation of *ddrC* was incorrect [20] and the *ddrC* gene was reannotated [21]. The newly annotated *ddrC* gene, called *A2G07_003810*, encodes a small basic protein with an apparent MW of approximately 25 kDa. An RDRM sequence was found 19 nt upstream the putative start codon of *A2G07_003810* (S1 Fig). DdrC gene has only homologs in bacteria belonging to *Deinococcaceae* and the encoded protein does not contain any predictable motif that might suggest a function for this protein. Here, we examined the regulation of the newly annotated DdrC protein, its localization in cells and we investigated its biochemical properties.

To better understand the *in vivo* functions of the DdrC protein, we first deleted the *ddrC* gene and showed that cells devoid of the DdrC protein were 10 times more sensitive to UV-radiation than wild-type cells when exposed to UV-doses higher than 750 J m⁻². Moreover, the *ddrC* deletion significantly increased UV-sensitivity of $\Delta uvrA$ or $\Delta uvsE$ mutant cells, but not UV sensitivity of the $\Delta uvrA \Delta uvsE$ double mutant, or $\Delta recA$ mutant cells. We propose several hypotheses to explain these phenotypes: the DdrC protein might be involved in both nucleotide excision repair (NER) and UVDE pathways or in recombinational repair of UV-lesions that takes place when the replication fork encounters residual unrepaired UV-lesions. DdrC might also participate in DNA repair of numerous DNA double strand breaks generated by exposure of cells to high doses of UV. Finally, DdrC might have an indirect effect on survival by protecting DNA against degradation.

We showed that the cellular concentration of DdrC is increased after irradiation, in a manner strongly dependent on the presence of the IrrE metalloprotease [26]. Moreover, the depletion of the DdrO protein results in an increase of the cellular concentration of the DdrC

protein, suggesting that the *ddrC* gene belongs to the RDR regulon. Interestingly, it was also proposed that the *ddrC* gene could be a target of the DrRRA protein, another important response regulator involved in radioresistance [35]. Therefore, the *ddrC* gene expression might be directly or indirectly under the control of several regulators, allowing a fine tuned expression of this gene in the cell. Recent analysis of RNA sequencing and proteomics performed in *D. deserti* [36] revealed, that its *ddrC* mRNA transcript was leaderless. To date, we do not have any evidence that the *A2G07_003810* mRNA is also leaderless.

Studies of cellular dynamics of DdrC protein showed that it was rapidly recruited into the nucleoid after exposure to γ -rays, suggesting that it interacts with DNA. We confirmed this by showing that, *in vitro*, the DdrC protein is able to interact with both ssDNA and dsDNA, with a binding preference for ssDNA and without DNA sequence specificity. Moreover, DdrC protected ssDNA and dsDNA against degradation by endo- or exonucleases. Furthermore, a pre-incubation of DdrC protein with supercoiled DNA was not a prerequisite to prevent DNA degradation from endonuclease, highlighting a rapid and efficient formation of nucleoprotein complexes. Other proteins, whose expression increased after irradiation, were also able to protect DNA from nuclease attack, as shown for DdrA which protects 3' single-stranded DNA ends against digestion by exonuclease I [11] and for PprA which protects linear dsDNA from degradation by exonuclease III [13]. It was previously shown that transient DNA degradation was observed rapidly after exposure of the cells to ionizing radiation [37] but this degradation has to be controlled to ensure DNA double strand break repair and cell survival. Thus, DdrC might prevent, along with DdrA and PprA, extensive DNA degradation of severely damaged DNA. Mattimore and Battista [38] suggested that *D. radiodurans* resistance to ionizing radiation is a consequence of its adaptation to dehydration. In the desiccated state, nucleases may still function whereas DNA repair processes requiring ATP may be inefficient. Thus, proteins able to protect DNA from nuclease attack such as DdrC, PprA, and DdrA [11,13], specific from *Deinococcaceae*, and highly induced after exposure to desiccation [7], may play an important role in the adaptation to dehydration.

Interestingly, when the DdrC protein was incubated with linearized plasmid DNA containing cohesive or blunt ends, re-circularized DNA was observed by transmission electron microscopy, suggesting that DdrC brings closer together the dsDNA ends by protein-protein interactions. To our knowledge, the spectacular efficiency of DdrC to circularize linear DNA has never been reported for any other *Deinococcus* protein, including PprA [39]. However, whereas the PprA protein was able to stimulate DNA ligase activity [13], we did not observe any evidence of the stimulation of DNA ligation by the DdrC protein.

Another feature shared by the PprA and the DdrC proteins is their rapid recruitment into the nucleoid after exposure to γ -radiation and their re-localization at the septum after completion of DNA repair [15]. However, even if PprA and DdrC share some properties, their absence does not have the same consequences on cell viability. In particular, cells devoid of the PprA protein are highly sensitive to ionizing radiation and exhibit a characteristic cell division abnormality after irradiation whereas cells devoid of the DdrC protein are as resistant to γ -rays as wild type cells [7]. Moreover, sensitivity to ionizing radiation of $\Delta pprA$ bacteria was slightly decreased when a *ddrC* deletion was combined with the *pprA* deletion [7]. Thus, the role of the apparent functional redundancies of the PprA and DdrC proteins in *Deinococcus* cells remains questionable.

Several properties of the DdrC protein are also reminiscent of those of the DdrB protein. Both proteins are rapidly recruited to the nucleoid after irradiation, and, *in vitro*, they bind with high affinity single-stranded DNA and promote annealing of complementary single-stranded DNA [9,10,40]. Moreover, the $\Delta ddrC \Delta ddrB$ double mutant was previously shown to be more sensitive to high doses of UV (1000 J m^{-2}) or γ -rays (10 kGy) than the single $\Delta ddrB$

mutant [7,17] suggesting that the DdrC protein may partially compensate *in vivo* the absence of DdrB. It has been proposed that the DdrB protein facilitates the assembly of a myriad of small fragments by a single strand annealing (SSA) process [8].

However, DdrB and DdrC do not share all their properties. The DdrB protein is an SSB-like protein that coats ssDNA [40]. Here, we show by TEM that the DdrC protein does not coat ssDNA but condenses it, leading to highly compacted structures when DdrC is present at high concentrations. The DdrC protein also binds dsDNA and we observed, by TEM, the formation of bridge and kink-like structures when the DdrC protein was incubated with supercoiled and linear DNA molecules, respectively. This suggests that DdrC may promote the juxtaposition of independently bound DNA molecules, likely via protein-protein interactions. The ability of DdrC to recognize single-strand regions within supercoiled DNA may also contribute to the formation of the bridged structures.

In vitro characterization of DdrC indicates that the DdrC protein is likely involved in several pathways of DNA metabolism. Redundancies of protein activities in DNA damage responses make difficult to determine an obvious role of DdrC in the ability of *D. radiodurans* to tolerate high levels of DNA damage. It might rapidly condense DNA after irradiation, maintain DNA fragments end to end, and thus limit dispersion of damaged DNA fragments and their extensive degradation. Through its ability to bind ssDNA and anneal complementary DNA strands, DdrC might also be an accessory protein that favors single strand annealing and homology search by the RecA protein. Further structural studies on DdrC protein and the search of DdrC partners will be necessary to unravel the function of DdrC *in vivo* and to provide clues about how this protein recognizes ssDNA and dsDNA, drives annealing of DNA complementary strands, juxtaposes independently bound molecules and favors circularization of linear DNA molecules.

Supporting information

S1 Fig. *D. radiodurans* A2G07_003810 locus sequence.
(PDF)

S2 Fig. Cells expressing His6-tagged, GFP-tagged and Cherry-tagged DdrC proteins are functional.
(PDF)

S3 Fig. Cellular localization of DdrC-Cherry after γ -irradiation of *D. radiodurans* cells.
(PDF)

S4 Fig. DdrC binds to ssDNA without preference of DNA sequence.
(PDF)

S5 Fig. DdrC protein does not stimulate DNA ligation of cohesive ends by T4 DNA ligase.
(PDF)

S1 Table. Bacterial strains and plasmids.
(PDF)

S2 Table. Oligonucleotides used for strain constructions.
(PDF)

Acknowledgments

We thank Moran Celestin (ELC lab) for his help to carry out EM experiments. We thank Adriana Bailone for critical reading of the manuscript, and Mickael DuBow for polishing our English.

Author Contributions

Conceptualization: CB ELC MM.

Funding acquisition: ELC FC.

Investigation: CB ELC FP LM MM PD.

Resources: CB MM PS.

Supervision: CB.

Writing – original draft: CB ELC FC PS SS.

References

- Blasius M, Sommer S, Hubscher U (2008) *Deinococcus radiodurans*: what belongs to the survival kit? Crit Rev Biochem Mol Biol 43: 221–238. <https://doi.org/10.1080/10409230802122274> PMID: 18568848
- Confalonieri F, Sommer S (2011) Bacterial and archaeal resistance to ionizing radiation. J Phys:Conf-Ser 261:
- Daly MJ (2009) A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. Nat Rev Microbiol 7: 237–245. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2073> PMID: 19172147
- Ishino Y, Narumi I (2015) DNA repair in hyperthermophilic and hyperradioresistant microorganisms. Curr Opin Microbiol 25: 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.010> PMID: 26056771
- Slade D, Radman M (2011) Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. Microbiol Mol Biol Rev 75: 133–191. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-10> PMID: 21372322
- Liu Y, Zhou J, Omelchenko MV, Beliaev AS, Venkateswaran A, Stair J, et al. (2003) Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 4191–4196. <https://doi.org/10.1073/pnas.0630387100> PMID: 12651953
- Tanaka M, Earl AM, Howell HA, Park MJ, Eisen JA, Peterson SN, Battista JR (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. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.029249> PMID: 15454524
- Bouthier de la Tour C, Boissard 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.
- Sugiman-Marangos SN, Weiss YM, Junop MS (2016) Mechanism for accurate, protein-assisted DNA annealing by *Deinococcus radiodurans* DdrB. Proc Natl Acad Sci U S A 113: 4308–4313. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520847113> PMID: 27044084
- Xu G, Lu H, Wang L, Chen H, Xu Z, et al. (2010) DdrB stimulates single-stranded DNA annealing and facilitates RecA-independent DNA repair in *Deinococcus radiodurans*. DNA Repair (Amst) 9: 805–812.
- Harris DR, Tanaka M, Saveliev SV, Jolivet E, Earl AM, et al. (2004) Preserving genome integrity: the DdrA protein of *Deinococcus radiodurans* R1. PLoS Biol 2: e304. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020304> PMID: 15361932
- Jolivet E, Lecointe F, Coste G, Satoh K, Narumi I, et al. (2006) Limited concentration of RecA delays DNA double-strand break repair in *Deinococcus radiodurans* R1. Mol Microbiol 59: 338–349. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04946.x> PMID: 16359339
- Narumi I, Satoh K, Cui S, Funayama T, Kitayama S, et al. (2004) PprA: a novel protein from *Deinococcus radiodurans* that stimulates DNA ligation. Mol Microbiol 54: 278–285. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04272.x> PMID: 15458422
- Devigne A, Guerin P, Lisboa J, Quevillon-Cheruel S, Armengaud J, et al. (2016) PprA protein is involved in chromosome segregation via its physical and functional interaction with DNA gyrase in irradiated *Deinococcus radiodurans* bacteria. mSphere 1: e00036–15.
- Devigne A, Mersaoui S, Bouthier-de-la-Tour C, Sommer S, Servant P (2013) The PprA protein is required for accurate cell division of gamma-irradiated *Deinococcus radiodurans* bacteria. DNA Repair (Amst) 12: 265–272.
- Kota S, Charaka VK, Ringgaard S, Waldor MK, Misra HS (2014) PprA contributes to *Deinococcus radiodurans* resistance to nalidixic acid, genome maintenance after DNA damage and interacts with

- deinococcal topoisomerases. PLoS One 9: e85288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085288> PMID: [24454836](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24454836/)
17. Selvam K, Duncan JR, Tanaka M, Battista JR (2013) DdrA, DdrD, and PprA: components of UV and mitomycin C resistance in *Deinococcus radiodurans* R1. PLoS One 8: e69007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069007> PMID: [23840905](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23840905/)
 18. Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, Tatusov RL, Minton KW, Koonin EV, Daly MJ (2001) Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. Microbiol Mol Biol Rev 65: 44–79. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.1.44-79.2001> PMID: [11238985](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11238985/)
 19. White O, Eisen JA, Heidelberg JF, Hickey EK, Peterson JD, Dodson RJ et al. (1999) Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. Science 286: 1571–1577. PMID: [10567266](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10567266/)
 20. de Groot A, Dulermo R, Ortet P, Blanchard L, Guérin BF, Vacherie B et al. (2009) Alliance of proteomics and genomics to unravel the specificities of Sahara bacterium *Deinococcus deserti*. PLoS Genetics 5: e1000434. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000434> PMID: [19370165](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19370165/)
 21. Hua X, Hua Y (2016) Improved complete genome sequence of the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1 obtained using Pacbio single-molecule sequencing. Genome Announc 4: e00886–16 <https://doi.org/10.1128/genomeA.00886-16> PMID: [27587813](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27587813/)
 22. Makarova KS, Omelchenko MV, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Zhai M, et al. (2007) *Deinococcus geothermalis*: The pool of extreme radiation resistance genes shrinks. PLoS ONE 2: e955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000955> PMID: [17895995](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17895995/)
 23. Devigne A, Ithurbide S, Bouthier de la Tour C, Passot F, Mathieu M, Sommer S, 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. <https://doi.org/10.1111/mmi.12991> PMID: [25754115](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25754115/)
 24. 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. <https://doi.org/10.1111/mmi.12774> PMID: [25170972](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25170972/)
 25. Wang Y, Xu Q, Lu H, Lin L, Wang L, Xu H et al. (2015) Protease activity of PprI facilitates DNA damage response: Mn²⁺-dependence and substrate sequence-specificity of the proteolytic reaction. PLoS One 10: e0122071. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122071> PMID: [25811789](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25811789/)
 26. Vujicic-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. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.12.062> PMID: [19150362](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19150362/)
 27. Menneccier S, Coste G, Servant P, Bailone A, Sommer S (2004) Mismatch repair ensures fidelity of replication and recombination in the radioresistant organism *Deinococcus radiodurans*. Mol Genet Genomics 272: 460–469. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1077-6> PMID: [15503140](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15503140/)
 28. Bouthier de la Tour C, Touelle M, Jolivet E, Nguyen HH, Servant P, Vannier F, Sommer S (2009) The *Deinococcus radiodurans* SMC protein is dispensable for cell viability yet plays a role in DNA folding. Extremophiles 13: 827–837. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0270-2> PMID: [19629621](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19629621/)
 29. Passot FM, Nguyen HH, Dard-Dascot C, Thermes C, Servant P, Espeli O, Sommer S. (2015) Nucleoid organization in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. Mol Microbiol 97: 759–774 <https://doi.org/10.1111/mmi.13064> PMID: [25988355](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25988355/)
 30. Kantake N, Madiraju MV, Sugiyama T, Kowalczykowski SC (2002) *Escherichia coli* RecO protein anneals ssDNA complexed with its cognate ssDNA-binding protein: A common step in genetic recombination. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 15327–15332. <https://doi.org/10.1073/pnas.252633399> PMID: [12438681](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12438681/)
 31. McGovern S, Baconnais S, Roblin P, Nicolas P, Drevet P, Simonson H, et al. (2016) C-terminal region of bacterial Ku controls DNA bridging, DNA threading and recruitment of DNA ligase D for double strand breaks repair. Nucleic Acids Res 44:4785–4806
 32. Moseley BE, Evans DM (1983) Isolation and properties of strains of *Micrococcus (Deinococcus) radiodurans* unable to excise ultraviolet light-induced pyrimidine dimers from DNA: evidence for two excision pathways. J Gen Microbiol 129: 2437–2445. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-8-2437> PMID: [6415229](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6415229/)
 33. Tanaka M, Narumi I, Funayama T, Kikuchi M, Watanabe H, Matsunaga T, et al. (2005) Characterization of pathways dependent on the *uvrE*, *uvrA1*, or gene product for UV resistance in *Deinococcus radiodurans*. J Bacteriol 187: 3693–3697. <https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3693-3697.2005> PMID: [15901692](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15901692/)
 34. Hamon L, Pastre D, Dupaigne P, Le Breton C, Le Cam E, Pietrement O (2007) High-resolution AFM imaging of single-stranded DNA-binding (SSB) protein—DNA complexes. Nucleic Acids Res 35: e58. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm147> PMID: [17392343](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17392343/)

35. Wang L, Xu G, Chen H, Zhao Y, Xu N, Tian B, Hua Y (2008) DrRRA: a novel response regulator essential for the extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *Mol Microbiol* 67: 1211–1222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06113.x> PMID: [18208531](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18208531/)
36. de Groot A, Roche D, Fernandez B, Ludanyi M, Cruveiller S, Pignol D, et al. (2014) RNA sequencing and proteogenomics reveal the importance of leaderless mRNAs in the radiation-tolerant bacterium *Deinococcus deserti*. *Genome Biol Evol* 6: 932–948. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu069> PMID: [24723731](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24723731/)
37. Slade D, Lindner AB, Paul G, Radman M (2009) Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans*. *Cell* 136: 1044–1055. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.018> PMID: [19303848](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19303848/)
38. Mattimore V, Battista JR (1996) Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *J Bacteriol* 178: 633–637. PMID: [8550493](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8550493/)
39. Murakami M, Narumi I, Satoh K, Furukawa A, Hayata I (2006) Analysis of interaction between DNA and *Deinococcus radiodurans* PprA protein by atomic force microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1764: 20–23. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.10.017> PMID: [16309981](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16309981/)
40. Norais CA, Chitteni-Pattu S, Wood EA, Inman RB, Cox MM (2009) DdrB protein, an alternative *Deinococcus radiodurans* SSB induced by ionizing radiation. *J Biol Chem* 284: 21402–21411. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.010454> PMID: [19515845](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19515845/)

A

```
gccttcagcg aactttaaga taattttctc cgtcctgcac actgaaaaat agccctgctt
ccgtgctgat ttgttatgtc aaaaacataa tctgtgctag aatatctgt atgaagaacgc
                                     RDRM                               m k n

tccgctgacc ctcaatttcg gctccgtgcg gctgcctgtc agcgcggacg gtttgcttca
a p l t l n f g s v r l p v s a d g l l

cgccccacc gccagcagc agctcgggct cacccaaagc tgggaagcgg cgctggtcga
h a p t a q q q l g l t q s w e a a l v

acacggcctg cccgagacgt accgcgactt cggcgccgga cccgaggccg ccgtgagcgt
e h g l p e t y r d f g a g p e a a v s

gcccgatttc gtggcgcttg ctttcgcoct cgacaccccc gaagcccggc gctggcagaa
v p d f v a l a f a l d t p e a r r w q

gcggggcggg gagctgctcg cccgcgccat gcagggcgac gtgcgcgtgg ctgcccagat
k r a r e l l a r a m q g d v r v a a q

tgccgagcgc aaccccgagc ctgacgcccg gcgctggctc gctgcccgac tggaaagcac
i a e r n p e p d a r r w l a a r l e s

tggcgcccgg cggaactgc tcgccaccgt cgcccggcac ggtggcgagg gccgggtcta
t g a r r e l l a t v a r h g g e g r v

cggtcagctc ggcagcatca gcaaccgcac cgtccttggc aaggacagcg cgtcggtagc
y g q l g s i s n r t v l g k d s a s v

tcaggaacgc ggcgtcaagg ccacccgcga cggcctgacg agcgcgaac tgctgcggct
r q e r g v k a t r d g l t s a e l l r

ggcctacatc gacaccgtga ccgcccgcgc cattcaggaa agcgaagcgc ggggcaacgc
l a y i d t v t a r a i q e s e a r g n

agccatcctc accctccacg aacaggtagc ccgcagcgag cgccagagct gggaacgggc
a a i l t l h e q v a r s e r q s w e r

gggccaggtg cagcgcgtag gctgagacaa gcgccataaa gaagctgccc ctatcttcca
a g q v q r v g STOP
```

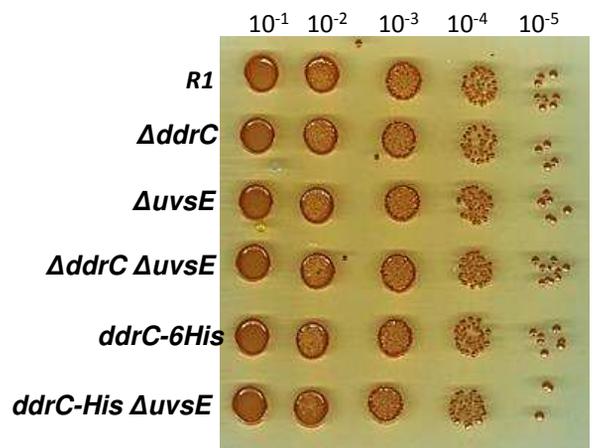
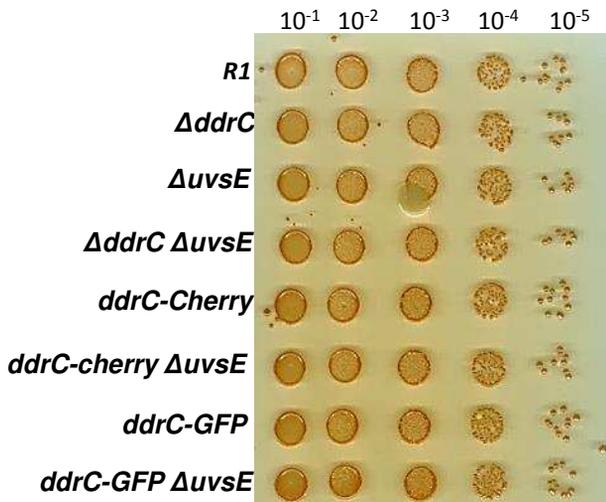
B

```
1      5      10     15
TTATGTNNTNAACGTAA RDRM consensus
  CC  C  A  G  AG
```

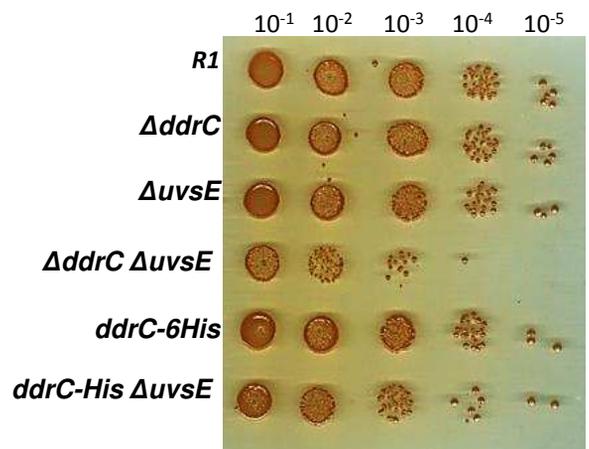
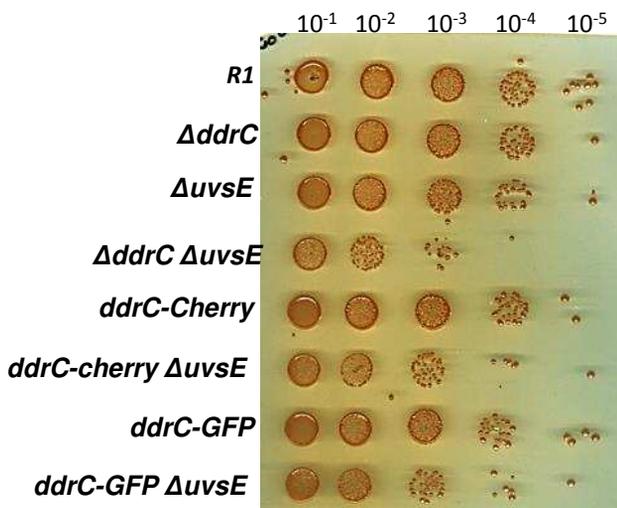
S1 Fig. D. radiodurans A2G07_003810 locus sequence

A Nucleotide sequence of the A2G07_003810 locus and deduced amino acid sequence of DdrC protein. The putative start codon is in bold and the RDRM motif is underlined. B Consensus sequence of RDRM sites (from [23]).

Non irradiated

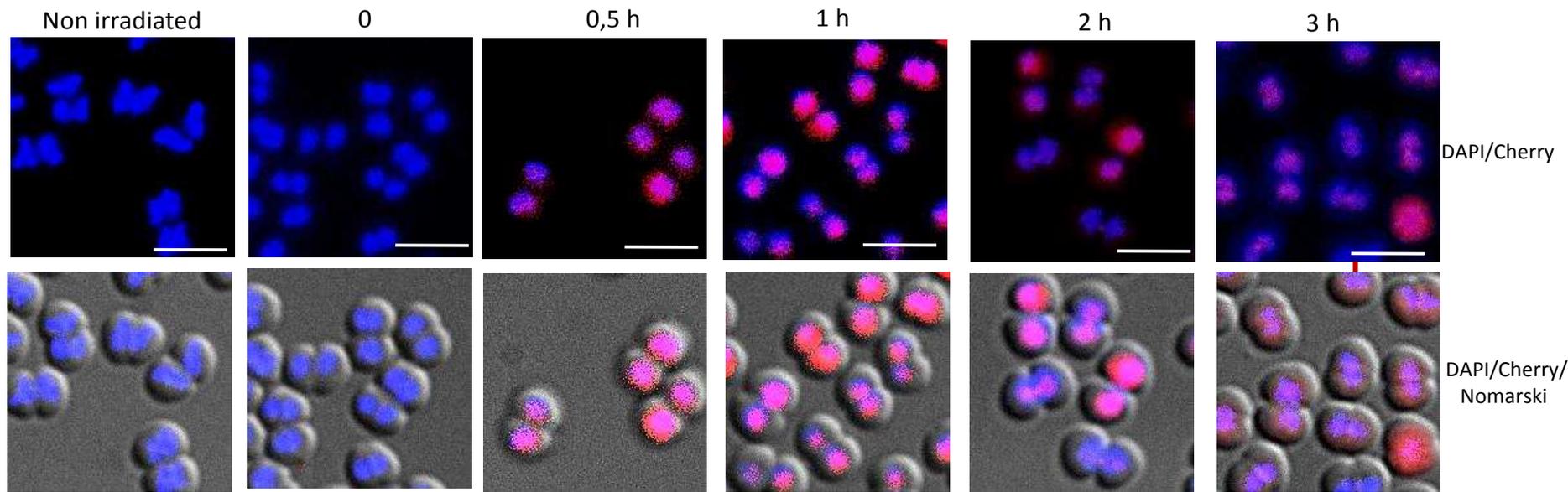


Irradiated



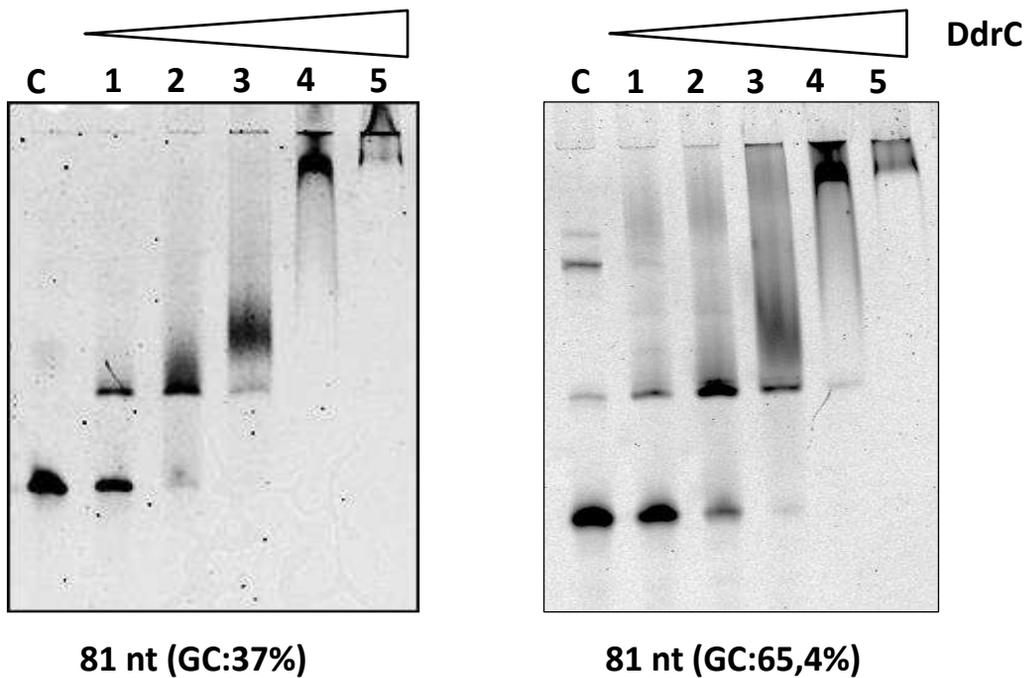
S2 Fig. Cells expressing His6-tagged, GFP-tagged and Cherry-tagged DdrC proteins are functional.

Wild type (R1), $\Delta ddrC$ (GY15929), $\Delta uvrE$ (GY15972), $\Delta ddrC \Delta uvrE$ (GY15974), *ddrC*::Cherry (GY15928), *ddrC*::Cherry $\Delta uvrE$ (GY16905), *ddrC*::GFP (GY15931), *ddrC*::GFP $\Delta uvrE$ (GY16906), *ddrC*::6His (GY16901), *ddrC*::6His $\Delta uvrE$ (GY16902) bacteria grown to an $A_{650nm} = 0.3$ were serially diluted in TGY2X broth and aliquots (10 μ l) of each dilution were spotted on TGY agar plates. Then, the plates were exposed to 500 J m⁻² UV radiation before incubation at 30°C for 3-5 days.



S3 Fig. Cellular localization of DdrC-Cherry after γ -irradiation of *D. radiodurans* cells.

Samples of irradiated cells (5 kGy) expressing the Cherry-tagged DdrC (GY15928) were taken at the indicated post-irradiation times and visualized by fluorescence microscopy (pink). DNA was stained with DAPI (blue). Overlays of Cherry and DAPI images, as well as overlays of Nomarski DIC, Cherry and DAPI are shown.



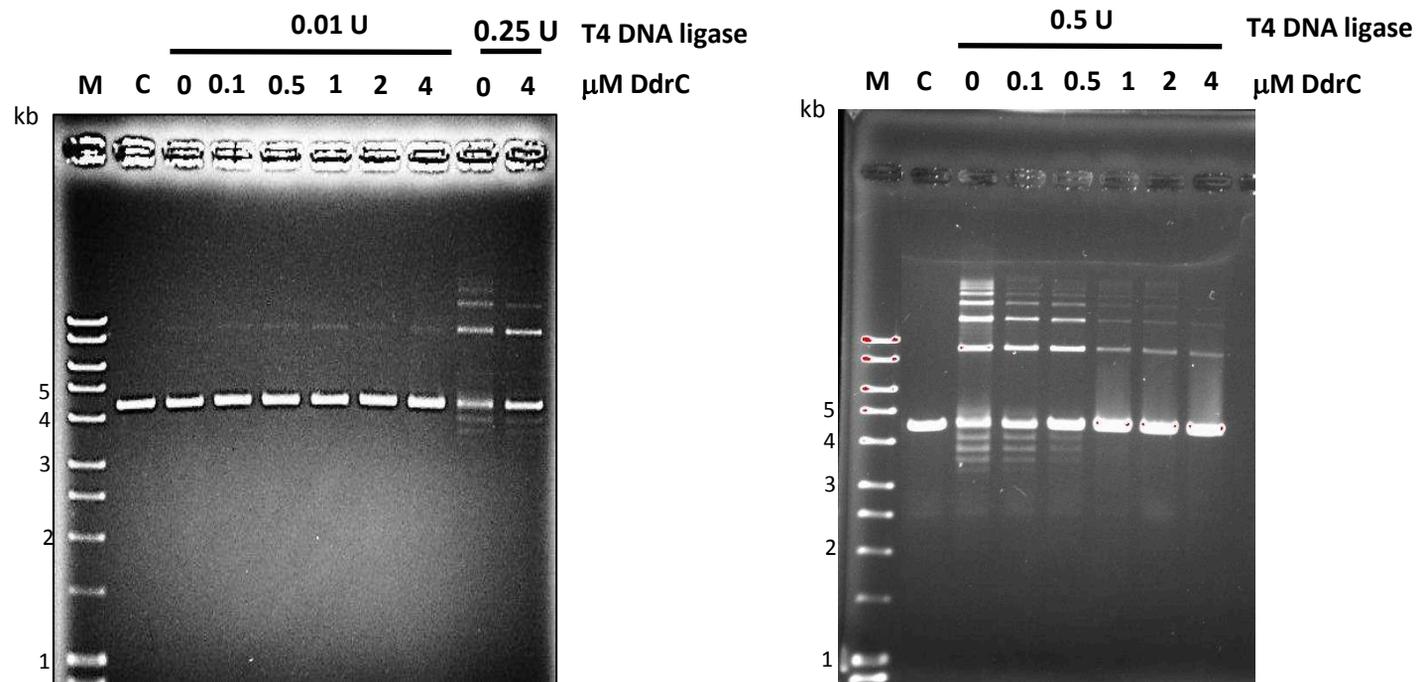
S4 Fig. DdrC binds to ssDNA without preference of DNA sequence.

Two 81-mer fluorescent oligonucleotides containing 37% or 65.4% GC were incubated with increasing concentrations of DdrC (0.175 μ M, 0.35 μ M, 0.7 μ M, 1.4 μ M, 2.8 μ M) (lanes 1-5). C: control DNA without protein. Reaction products were separated on a 6% native polyacrylamide gel.

Oligonucleotides sequence:

Cy5gattaccacgaggagtatcttaagaattctgatatacttgaagaagacatacaggaacaagaacaaagactgaacgagctt (37%GC)

Cy5gttgctggacgtacagcgccactatggccgctgggctggaccagcggcgagattccgtccgggggctaccagtttccat (65.4%GC).



S5 Fig. DdrC protein does not stimulate DNA ligation of cohesive ends by T4 DNA ligase

Linear dsDNA (PstI-digested pBR322, 200 ng) was preincubated in the absence or the presence of the indicated DdrC protein concentrations for 15 min at 4°C prior addition of T4 DNA ligase. The ligation assays were performed with 3 different concentrations (0.01 U, 0.25 U, 0.5 U) of T4 DNA ligase at 30°C for 15 min. The reactions were stopped by addition of proteinase K and SDS and samples were subjected to electrophoresis through a 1% agarose gel.

Bacterial strains	Description	Source or reference
D. radiodurans		
R1	Wild type, ATCC 13939	Laboratory stock
GY 15929	Δ ddrC Ω kan	This work
GY 15921	ddrC::HA::kan	This work
GY 15931	ddrC::GFP::cat	This work
GY 15928	ddrC::Cherry::kan	This work
GY 15950	Δ irrE Ω cat	This work
GY 15967	ddrC::HA::kan Δ irrE Ω cat	This work
GY 15971	Δ uvrA Ω cat	This work
GY 15972	Δ uvsE Ω hygro	This work
GY 15973	Δ ddrC Ω kan Δ uvrA Ω cat	This work
GY 15974	Δ ddrC Ω kan Δ uvsE Ω hygro	This work
GY 15977	Δ uvrA Ω cat Δ uvsE Ω hygro	This work
GY 15978	Δ ddrC Ω kan Δ uvrA Ω cat Δ uvsE Ω hygro	This work
GY 16901	ddrC::6His::cat	This work
GY16902	ddrC::6His::cat Δ uvsE Ω hygro	This work
GY16903	ddrC::HA::kan Δ uvsE Ω hygro	This work
GY15180	Δ recA Ω cat	Laboratory stock
GY15965	Δ recA Ω cat Δ ddrC Ω kan	This work
GY14164	Δ ddrO Ω cat/p11891(prepuTs::ddrO ⁺)	[23]
GY16917	[ddrC::HA::kan Δ ddrO Ω cat/p11891(prepuTs::ddrO ⁺)]	This work
GY16905	ddrC::Cherry::kan Δ uvsE Ω hygro	This work
GY16906	ddrC::GFP::cat Δ uvsE Ω hygro	This work

E. coli

DH5 α	supE44 Δ lacU(Δ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1-relA1	Laboratory stock
Rosetta2(DE3)pLysS	F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm (DE3) pLysSRARE2 (CamR)	Novagen

Plasmids

p11086	Source of kan cassette	Laboratory stock
pPS6	Source of cat cassette	Laboratory stock
p12625	Source of hygro cassette	Laboratory stock
p12764	Source of HA::kan cassette	Laboratory stock
pFAP223	Source of GFP::cat cassette	Laboratory stock
pFAP208	Source of Cherry::kan cassette	Laboratory stock
p11891	p13841:prepUTs::ddrO	[23]
pET26b	pET expression system, pT7lac, C-terminal 6His-tag	Novagen
pET26b-ddrC	pET26b NdeI/XhoI+ PCR fragment containing ddrC	This work

S1 Table: Bacterial strains and plasmids

E88	ATTGGATCCCGACGGCCAGTGAATTCGAG
Primers used to amplify HA::kan, GFP::cat, and Cherry::kan cassettes	
PS455	GACCGGATCCTACCCGTACGACGTGCCCGA
PS457	AAATTCTAGACGAATTGGGCCCGGTCTGAC
pCR21m	CACAGGAAACAGCTATGACC
pCR21v	AAACGACGGCCAGTGAATTG
Primers used to amplify the ddrC gene for cloning in the pET26b expression vector	
DdrC-Nde	GAGGCACAACATATGAAGAACGCTCCGCTGACCCT
DdrC-Xho	ACGTCTCGAGGCCTACGCGCTGCACCTGGC

S2 Table. Primers used in this study

Titre : Régulation de la réponse à divers stress et réparation des cassures double brin de l'ADN chez la bactérie *Deinococcus radiodurans*.

Mots clés : *Deinococcus radiodurans*, réponse au stress, facteur de transcription, RecN, recombinaison homologue.

Résumé : La bactérie *Deinococcus radiodurans* se distingue par sa résistance exceptionnelle aux rayonnements γ , UV, à la dessiccation et au stress oxydant. La radioresistance de *D. radiodurans* résulte de l'association de plusieurs mécanismes, dont des systèmes efficaces de réparation de l'ADN et de détoxification des ROS, la protection des protéines contre l'oxydation, une structure compacte du nucléoïde et des protéines spécifiques aux *Deinococcaceae*, qui sont fortement induites après l'exposition des cellules au rayonnement γ . Le gène *ddrI* (DNA damage response) est fortement induit après exposition des cellules au rayonnement γ et code un régulateur transcriptionnel appartenant à la sous-famille CRP (cAMP receptor protein). Comparée à la souche sauvage, la souche privée de *DdrI* présente des défauts de division cellulaire et/ou de ségrégation de l'ADN, et est sensible aux agents génotoxiques, au stress oxydant et au choc thermique. La prédiction *in silico* des cibles potentielles de *DdrI* suggère que cette protéine régule l'expression d'une centaine de gènes impliqués dans la réplication, la réparation de l'ADN, la transduction de signal, la réponse au stress oxydant et au choc thermique. La séquence consensus 5'TGTGA(N6)TCACA3', extrapolée à partir des 115 séquences cibles potentielles de *DdrI*, est spécifiquement fixée par *DdrI* uniquement en présence d'AMPc.

Après un choc thermique, *DdrI* induit directement ou indirectement l'expression de nombreux gènes codant des protéases, des protéines du métabolisme de l'ADN, des lipides, des carbohydrates ainsi qu'un inhibiteur de la traduction.

PprA, une protéine spécifique aux *Deinococcaceae*, joue un rôle crucial dans la radioresistance et est impliquée dans la ségrégation des chromosomes et/ou la division cellulaire après réparation de l'ADN. De manière intéressante, l'absence de *RecN*, une protéine de la famille SMC, supprime la sensibilité du mutant Δ *pprA* aux agents génotoxiques, aux inhibiteurs de l'ADN gyrase et les défauts de ségrégation observés dans le mutant *pprA* après irradiation des cellules. Après exposition des cellules au rayonnement γ , l'absence de *RecN* réduit la fréquence de recombinaison entre ADN chromosomique et plasmidique, suggérant que *RecN* intervienne dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue. Nous proposons un modèle, dans lequel *RecN*, en favorisant la réparation de l'ADN par recombinaison homologue, nécessite la présence de *PprA* pour favoriser le recrutement des ADN topoisomérases et la résolution des contraintes topologiques engendrées par ce mécanisme de réparation d'ADN.

Title : Response regulation to various stresses and DNA double strand break repair in the bacterium *Deinococcus radiodurans*.

Keywords : *Deinococcus radiodurans*, stress response, transcription regulator, RecN, homologous recombination.

Abstract : The *Deinococcus radiodurans* bacterium exhibits resistance to γ and UV radiation, desiccation and oxidative stress. The molecular mechanisms contributing to the radioresistance of *D. radiodurans* include very efficient DNA repair mechanisms and ROS detoxification systems, protein protection against oxidation, a compact nucleoid structure and a subset of *Deinococcus* specific genes which are strongly induced after γ radiation. The *ddrI* (DNA damage response) gene is highly up-regulated after exposure to γ radiation and encodes a transcription factor belonging to the CRP (cAMP receptor protein) family. Compared to wild type cells, cells devoid of *DdrI* display defects in cell division and/or DNA segregation and is sensitive to DNA damaging agents, oxidative stress and heat-shock treatment. *In silico* predictions of putative *DdrI* targets suggest that hundreds of genes, belonging to various cellular processes (DNA replication and repair, oxidative stress and heat shock responses, regulation of transcription and signal transduction) may be regulated by *DdrI*. The pseudopalindromic 5'TGTGA(N6)TCACA3' consensus sequence, extrapolated from 115 potential *DdrI* binding sites, is specifically bound by *DdrI* only in presence of cAMP.

After heat shock treatment, *DdrI* is involved directly or indirectly, in the induction of heat shock response genes coding proteases, proteins involved in DNA, lipid, carbohydrate metabolism and a translation inhibitor. Among the *Deinococcus* specific proteins required for radioresistance, the *PprA* protein was shown to play a major role for accurate chromosome segregation and cell division after completion of DNA repair. Here, we analyzed the cellular role of the *RecN* protein belonging to the SMC family and, surprisingly, observed that the absence of the *RecN* protein suppressed the sensitivity of cells devoid of the *PprA* protein to γ - and UV-irradiation and to treatment with mitomycin C or DNA gyrase inhibitors. The absence of *RecN* also alleviated the DNA segregation defects displayed by the *pprA* cells recovering from irradiation. After irradiation, the absence of *RecN* reduced recombination between chromosomal and plasmid DNA, indicating that the *RecN* protein is important for recombinational repair of DNA lesions. Here, we propose a model in which *RecN*, by favoring recombinational repair of DNA double strand breaks, requires the *PprA* protein to facilitate the recruitment of the DNA topoisomérases to resolve the topological constraints generated by DNA double strand break repair through homologous recombination.

