



HAL
open science

Dynamique de la réplication chez l'archée *Haloferax volcanii*

Yoann Collien

► **To cite this version:**

Yoann Collien. Dynamique de la réplication chez l'archée *Haloferax volcanii*. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT: 2019SACLX063 . tel-02439197

HAL Id: tel-02439197

<https://theses.hal.science/tel-02439197v1>

Submitted on 14 Jan 2020

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.

Dynamique de la réplication chez l'archée *Haloferax volcanii*

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

Préparée à l'Ecole Polytechnique

École doctorale n°573 : interfaces : approches interdisciplinaires,
fondements, applications et innovation (Interfaces)

Spécialité de Doctorat : Biologie

Thèse présentée et soutenue à Palaiseau, le 14 octobre 2019, par

M. Yoann COLLIEN

Composition du Jury :

Tamara BASTA LE-BERRE MC, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC) (UMR 9198)	Rapporteuse
Didier FLAMENT Chercheur, Directeur Adjoint, Ifremer (UMR 6197)	Rapporteur
Marc NADAL Professeur, Université Paris Diderot (UP7) (UMR 7592)	Président
Bruno FRANZETTI DR, Institut de Biologie Structurale (IBS) (UMR 5075)	Examinateur
Stéphane KOUNDRIOUKOFF MC, Institut Gustave Roussy (UMR 8200)	Examinateur
Hannu MYLLYKALLIO DR2, Ecole Polytechnique (UMR 7645)	Directeur de thèse
Roxane LESTINI MC, Ecole Polytechnique (UMR 7645)	Co-Directrice de thèse

Remerciements :

Je tiens à remercier en premier lieu Roxane Lestini pour m'avoir accepté comme stagiaire durant mon M2, et d'avoir cru en moi pour une thèse. Son soutien constant, sa patience et sa bonne humeur ont été les ingrédients nécessaires à la réussite de ma thèse, qu'elle m'a fournie sans compter. Merci de m'avoir répété les choses autant de fois qu'il l'a fallu et de m'avoir guidé. Merci de m'avoir permis d'aborder sereinement ce petit voyage, avec ses détours prévisibles, et ceux qui l'étaient moins. Merci d'avoir joué ton rôle exactement comme j'en avais besoin. Merci également de m'avoir supporté, certains disent que c'est difficile, mais moi je pense ceux-là se trompent !

Je remercie Hannu Myllykallio pour son suivi tout au long de ma thèse, pour son expérience et son regard critique et pertinent, qui m'ont permis de progresser en me posant les bonnes questions.

Je remercie Katherin Marheineke et Olivier Haccard de l'équipe Institute of Integrative Biology of the Cell (I2BC) sur le campus du CNRS à Gif-sur-Yvette, pour avoir cru en mon projet et s'y être pleinement investis. Ils n'ont pas compté leur temps passé avec moi et je leur dois l'intégralité du peignage moléculaire.

Je remercie également Nicolas Olivier et Pierre Mahou, ils m'ont apporté une aide indispensable au bon déroulement de mes projets, et leur professionnalisme m'a fait gagner beaucoup de temps.

Je remercie François Hache, directeur du laboratoire, pour sa bienveillance générale et pour m'avoir accepté dans son laboratoire.

Je remercie le pôle biologie du laboratoire dans son ensemble, pour leurs conseils, l'ambiance de travail, et le temps qu'ils m'ont accordé.

Je remercie Laure Lachapelle et Christelle Français pour leur travail qui permet au laboratoire de fonctionner, pour leur professionnalisme, leur investissement et leur envie permanente de bien faire les choses. Je ne suis jamais reparti de leur bureau les mains vides.

Je remercie le laboratoire d'une manière générale pour l'ambiance et le confort dans le travail qu'il apporte, même si je pense que la moitié de mes blagues n'ont pas été comprises, et que l'autre moitié... je n'ai pas pu les faire.

Je remercie les étudiants du laboratoire pour leur énergie, leur bonne humeur, et les moments de détente, au labo comme plus tard le soir. Un merci spécial à mes collègues de bureau : Margaux, Clothilde, Alice et Anastasia pour ces discussions parfois philosophiques sur comment refaire le monde.

Je remercie également toutes les personnes qui m'ont aidé sans être au labo : ma famille. Merci pour votre temps, votre écoute et vos conseils, parce que la thèse ne se limite pas qu'au temps passé au laboratoire. Un merci spécial à mes deux correctrices : ma mère et ma grand-mère.

Un merci particulier à celle qui partage ma vie. Merci de m'avoir donné ton temps sans compter, surtout en cette période de rédaction, pour que mon travail puisse être fait dans les temps. Moi je me suis concentré sur le bon déroulement de ma thèse, et toi tu t'es concentré sur le bon déroulement de notre vie à tous les trois, en plus de ton travail. Merci d'en avoir fait autant pour moi et de m'avoir soutenu, de m'avoir écouté et de m'avoir motivé. Merci de m'avoir fait le plus beau cadeau que l'on puisse faire, et merci de t'en être occupé pour deux quand je n'étais pas disponible. Margaux et Logan, je vous aime, vous êtes la principale raison de mon envie de bien faire les choses.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	8
------------------------------	---

Introduction

I] La place des archées dans le monde du vivant	11
1) Les trois domaines du vivant.....	11
2) Les archées.....	16
II] La réplication	21
1) Généralités.....	21
2) Discussion sur la régulation de l'initiation	27
3) <i>Haloferax volcanii</i> en tant que modèle d'étude	30
III] Microscopie	32
1) Contraintes biologiques et principes des techniques de microscopie associées.....	32
2) Principe du marquage de l'ADN et techniques associées permettant son observation	38
3) Le marquage des protéines et de l'ADN comme outil pour étudier la réplication	40
IV] Les objectifs du travail de thèse.....	43

Matériel et méthode

I] Souches et Culture cellulaire	45
1) <i>Haloferax volcanii</i>	45
2) <i>Escherichia coli</i>	46
3) <i>Halobacterium salinarum</i>	47
II] Délétion de gènes chez <i>H. volcanii</i>	47
1) Principe	47
2) Construction de plasmides intégratifs	49
3) Transformation d' <i>Escherichia coli</i>	51
4) Transformation d' <i>Haloferax volcanii</i>	52
III] Surexpression de la thymidine kinase	55
IV] Marquage de l'ADN néosynthétisé	56
V] Détection de l'ADN marqué par les analogues de la thymidine	57
1) EdU.....	57
2) Les analogues halogénés de la thymidine : le cas de la BrdU	57
VI] <i>Time lapse</i>	60

Résultats

I] Construction de souches permettant un marquage de l'ADN	63
1) Construction d'une souche capable d'incorporer efficacement les analogues de la thymidine : HvYC0...	65
2) Construction de souches permettant une étude approfondie de la réplication	75
3) Optimisation de l'incorporation des analogues de la thymidine	76
4) Sur-expression de la thymidine kinase.....	80
II] Localisation de l'ADN néosynthétisé et détermination du nombre de sites de réplication dans la cellule.....	84
III] Etude de l'activation des origines de réplication à l'échelle du chromosome	111
IV] Suivi de la réplication au cours du temps.....	114
Discussion et perspectives.....	119
Bibliographie.....	126

LISTE DES ABREVIATIONS

DO	Densité optique
DS	Downstream (région aval)
<i>hdrB</i>	2 ^{ème} gène de la dihydrofolate réductase chez <i>H. volcanii</i>
<i>hts</i>	Gène de la thymidylate synthase
LB	Lysogny broth Medium
LUCA	Last Universal Common Ancestor (Dernier ancêtre commun universel)
M	Molaire (g/mol)
MCM	Mini-Chromosome Maintenance
ON	<i>Over night</i> : sur la nuit
ORB	Origin Recognition Boxes : Séquences reconnues par les ORPs
ORP	Origin Recognition Protein : Protéine de reconnaissance des origines
PCNA	Proliferating Nuclear Antigen A
PIP	PCNA Interaction Protein
RFC	Replication Factor C
RPA	Replication Protein A
rpm	Rotations par minute
RT	Room Temperature : Température ambiante
SSB	Single Strand Binding protein (protéine de fixation à l'ADN simple-brin)
TE	Tris-EDTA
US	Upstream (région amont)
GFP	Green Fluorescent Protein (Protéine Fluorescente verte)
DIC	Differential Interference Contrast (Contraste de phase interférentiel)

SIM	Structured Illumination Microscopy (Microscopie à Illumination Structurée)
STED	Stimulated Emission Depletion
STORM	Stochastique Optical Reconstruction Microscopy
PALM	Photo-Activated Localisation Microscopy
BrdU	5-Bromo-2'-déoxyridine
CldU	5-Cloro-2'-déoxyridine
IdU	5-Iodo-2'-déoxyridine
EdU	5-Ethynyl-2'-déoxyridine
SLIC	Sequence and Ligation Independent Cloning
5-FOA	5-Fluoro-uracile
DIG	Digoxygénine

Introduction

I] LA PLACE DES ARCHEES DANS LE MONDE DU VIVANT

1) LES TROIS DOMAINES DU VIVANT

Découverte des trois domaines du vivant

On recense à ce jour près de 1,75 million d'espèces vivantes sur terre, auxquelles viennent s'ajouter 16 000 nouvelles espèces chaque année (Gilles Boeuf 2014). On estime par ailleurs que l'ordre de grandeur du taux d'extinction des espèces est de l'ordre de 1 à 2% depuis 100 000 ans (Stork 2010). Dans un souci de compréhension du monde qui les entoure, les scientifiques ont depuis toujours cherché à classer ces espèces les unes par rapport aux autres. L'intérêt de ce type de classement est multiple : il permet de retracer l'histoire évolutive des êtres vivants et de connaître leurs liens de parenté. Cela permet de créer des groupes d'espèces possédant des caractéristiques similaires, et desquelles on peut étendre les connaissances obtenues sur un membre au reste du groupe, ou de les comparer à un autre groupe.

Initialement basés sur des critères morphologiques (par exemple la classification Linnéenne en 1735), ces premiers classements furent abandonnés au profit de classements basés sur l'analyse de marqueurs génétiques et protéiques, menant à la création d'un nouveau type de classement : les arbres phylogénétiques, initiés par Charles Darwin (1859).

Vers les années 1950, à la suite de travaux initiés par Ferdinand Cohn, apparaît une définition et une classification du monde vivant en deux grands groupes basés sur la structure de leurs cellules : d'un côté les organismes eucaryotes, formés de cellules possédant un noyau et compartimentées, et de l'autre les organismes procaryotes (différents de la notion des bactéries actuelles), formés de cellules non compartimentées et se divisant par fission binaire (Ro Y. Stainer and C.B. Van Niel 1962). En 1964, Zuckerkandl et Pauling ont proposé le séquençage et la comparaison de certaines molécules (ADN et protéines) comme nouvelle méthode de classification. Ces molécules, de par leur distribution universelle et leur conservation dans le vivant (car elles évoluent lentement), offrent la possibilité de les utiliser pour l'étude des relations entre des organismes très éloignés (Zuckerkandl and Pauling 1965). Durant les années

70, c'est dans cette idée que Carl Woese et George Fox développent une technique de comparaison des séquences d'ARN de la petite sous-unité du ribosome (ARN 18S chez les eucaryotes et ARN 16S chez les procaryotes), et découvrent que non seulement les microorganismes méthanogènes ne font pas partie des bactéries, mais également qu'ils sont aussi éloignés de ces dernières que des eucaryotes (Woese and Fox 1977). Cette découverte a permis de comprendre que le monde vivant ne se divisait pas en deux domaines (basé sur la présence ou non d'un noyau), mais en trois grands domaines : les eucaryotes, les bactéries et les archées (Woese, Kandler, and Wheelis 1990) (Fig. 1a).

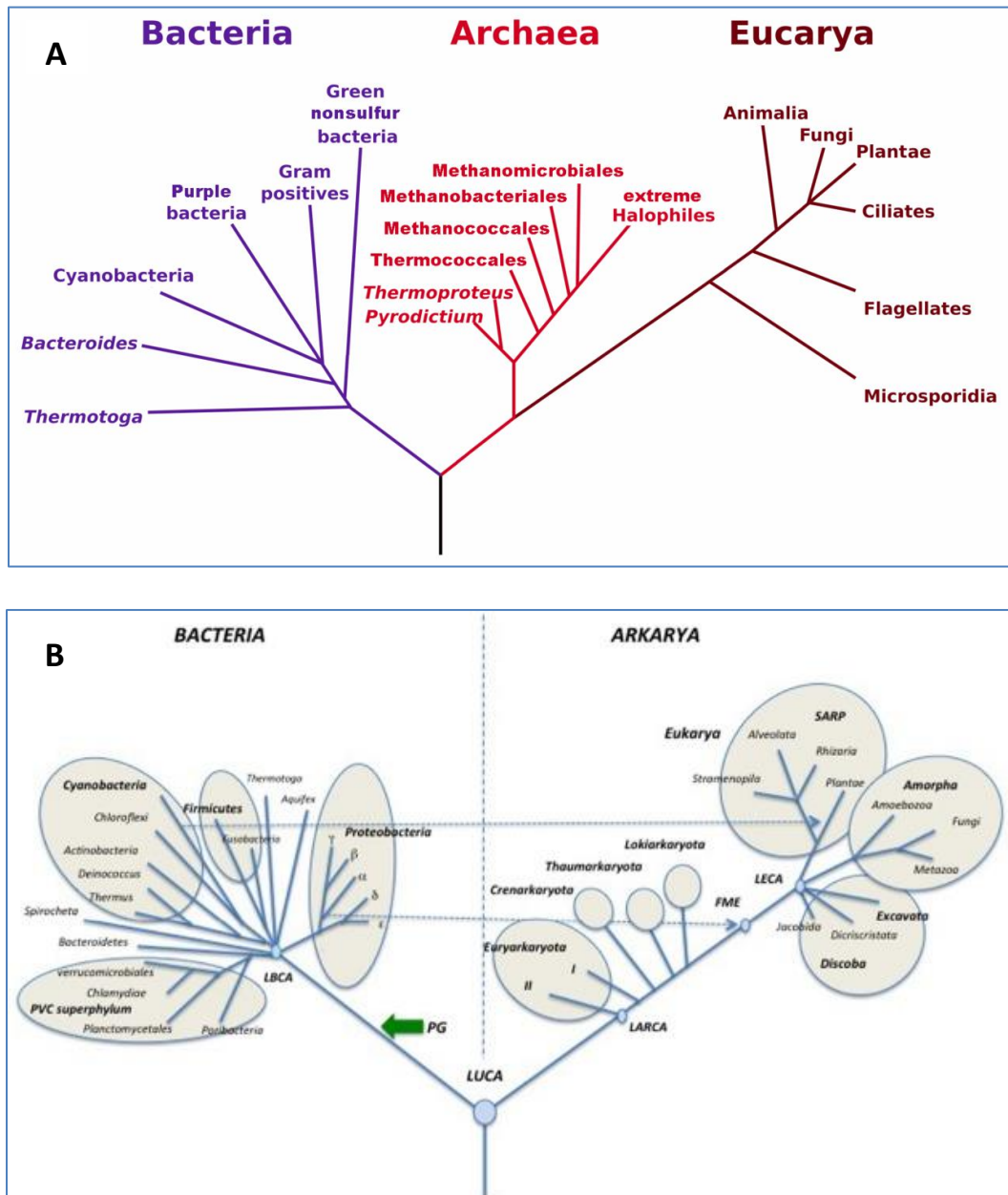


Figure 1 : Différents arbres phylogénétiques. (A) Arbre phylogénétique proposé par Woese *et al.*, 1990. (B) Arbre phylogénétique proposé par Spang *et al* 2015. Illustration de Forterre P. 2015 (Patrick Forterre 2015).

Ces résultats, associés à ceux de la biologie moléculaire, ont permis de construire un nouvel arbre phylogénétique, et d'apporter un argument supplémentaire en faveur de l'unité du monde vivant, ce qui suggère que tous les êtres vivants descendent d'un même ancêtre commun : LUCA (*Last Universal Common Ancestor*).

Généralité sur les caractéristiques des trois domaines

Voici quelques éléments caractéristiques de chacun des trois domaines du vivant :

- Les Bactéries, qui comprennent actuellement 92 phyla identifiés (Protéobactéria, Actinobacteria, Chlamydiae...) (Hug et al. 2016), sont des organismes unicellulaires procaryotes, c'est-à-dire que leurs cellules ne sont pas compartimentées. Elles ont une taille comprise entre 0,5 et 5 μm de longueur. Elles possèdent en général un chromosome circulaire, contenant une seule origine de réplication à l'opposé de laquelle se trouve la région de terminaison de la réplication. Les gènes peuvent être regroupés en opérons, et la traduction peut s'effectuer en même temps que la transcription.
- Les Eucaryotes comprennent actuellement 5 phyla identifiés (Animalia, Plantae, Fungi...) (Ruggiero et al. 2015). On y trouve à la fois des organismes unicellulaires et pluricellulaires, microscopiques et macroscopiques, dont les cellules sont compartimentées. Ces compartiments correspondent à des organites (noyau, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, mitochondries...) qui sont délimités par une membrane et possédant une fonction précise dans la cellule. Ces cellules possèdent un cytosquelette dynamique. La taille d'une cellule eucaryote est comprise entre 10 et 100 μm . Leur ADN est contenu dans le noyau de la cellule, il est composé de chromosomes linéaires possédant de nombreuses origines de réplication. Leurs gènes possèdent des introns et des exons, des mécanismes d'épissage étant nécessaires pour l'obtention d'ARN messagers (ARNm).
- Les Archées comptent actuellement 26 phyla identifiés (Crenarchaeota, Euryarchaeota, Thaumarchaeota...) (Hug et al. 2016). Ce sont des organismes unicellulaires procaryotes, possédant une taille comprise entre 0,1 et 15 μm . Elles possèdent un ou plusieurs chromosomes circulaires contenant une ou plusieurs origines de réplication. Les gènes peuvent être regroupés en opérons. Leurs protéines de réplication et de réparation de l'ADN sont semblables à celles trouvées chez les eucaryotes (Myllykallio et al. 2000; Raymann et al. 2014; Yao and O'Donnell 2016). Les archées sont connues pour leur capacité à coloniser les milieux extrêmes, mais elles sont ubiquitaires. Il n'y a pas d'archées pathogènes connues à ce jour. Les archées possèdent une voie

métabolique qui leur est propre : la méthanogenèse (Liu and Whitman 2008), ainsi qu'une composition de lipide membranaire unique (Gottlieb et al. 2016).

Les découvertes régulières de nouvelles espèces d'archées modifient leur arbre phylogénétique, (Brochier-Armanet et al. 2008), ainsi que leur place dans le monde du vivant (Eme et al. 2017). De ce fait, on est passé successivement d'un arbre à deux branches (avant la découverte des archées), avec une branche pour les procaryotes et une pour les eucaryotes dont l'unique ramification correspond au dernier ancêtre commun partagé par l'ensemble de l'arbre (LUCA : *Last Universal Common Ancestor*), à un arbre à deux branches principales comprenant une ramification sur la branche partagée entre les archées et les eucaryotes (Woese, Kandler, and Wheelis 1990; Eme et al. 2017) (Fig. 1a). Cette seconde ramification correspond au dernier ancêtre commun entre les archées et les eucaryotes (LARKA : *Last Arkarya common Nestor*). La découverte en 2015 d'une nouvelle famille d'archée, ainsi que la découverte de certaines protéines chez ces archées qui sont considérées comme spécifiques des eucaryotes (actine (Ettema, Lindås, and Bernander 2011), tubuline (Yutin and Koonin 2012)...) vient à nouveau ébranler les fondations de l'arbre phylogénétique. Les archées du phylum Asgard seraient, selon Spang *et al* (Spang et al. 2015; Eme et al. 2017), les ancêtres des eucaryotes, et à la base du processus d' « eucaryogénèse », c'est-à-dire la création d'une cellule eucaryote à partir de son ancêtre procaryote. Un nouvel arbre phylogénétique est donc proposé (Fig. 1b). Ce nouvel arbre ne fait cependant pas l'unanimité auprès de la communauté scientifique et fait l'objet de controverses (Patrick Forterre 2015).

Bien que l'origine de la cellule eucaryote ne soit pas connue, l' « eucaryogénèse » étant un scénario possible, il ne fait aucun doute que les archées possèdent une relation de parenté avec les eucaryotes. Connaître leur place exacte dans l'arbre du vivant est donc un élément essentiel à l'évolution de nos connaissances.

LUCA et LARKA

La recherche de parenté entre les espèces nous permet de savoir quels mécanismes moléculaires sont partagés entre les différents domaines du vivant ou, à plus petite échelle, entre les différentes familles. De telles connaissances permettent de choisir un modèle d'étude pertinent selon les questions scientifiques qui sont posées. Dans le cas de ma thèse, quels types d'organismes sont susceptibles de nous apporter des informations supplémentaires sur le fonctionnement de la réplication chez les eucaryotes ?

Pour y répondre, on peut se demander à quoi ressemblaient les ancêtres LUCA et LARKA, afin de nous aider à savoir quels mécanismes ont été hérités depuis ces ancêtres et quels organismes les partagent.

Quelles fonctions possédait LUCA ou LARKA ? Pour répondre à cette question, on peut chercher les points communs entre tous leurs descendants. Dans le cas de LUCA, si l'on se penche sur « l'hypothèse du monde ARN » (Attwater et al. 2010), LUCA aurait directement hérité de ce monde l'activité catalytique des ARN, car elle est conservée dans l'ensemble du vivant. Le code génétique est également identique pour tous les êtres vivants, suggérant que LUCA était également capable de synthétiser des protéines. LUCA possédait aussi probablement des polymères d'ADN car un homologue de l'enzyme responsable de la synthèse des désoxynucléotides (ribonucléotide réductase) est retrouvé dans les trois domaines (Patrick Forterre, Jonathan Filée 2004). De même, les protéines impliquées dans la recombinaison de l'ADN (RecA chez les bactéries et Rad51 chez les eucaryotes) sont homologues. LUCA possédait probablement de l'ADN, de l'ARN, des protéines, des ribosomes, des ARNt, des recombinases et un système de réparation de l'ADN (Yao and O'Donnell 2016).

Cependant, les protéines de réplication de l'ADN ne sont pas homologues, bien que très semblables au niveau de leur structure tri-dimensionnelle. Il existe sept familles d'ADN polymérase (A, B, C, D, X, Y et RT), les familles A, B et Y présentent des homologies de structure, ainsi que C et X. Les bactéries utilisent la famille C pour répliquer leur ADN, les eucaryotes la famille B, et les archées la famille B et D. Cela suggère que la machinerie de réplication aurait pu évoluer deux fois de manière indépendante depuis LUCA : une fois chez l'ancêtre commun des bactéries (LBCA), et une fois chez LARKA (Patrick Forterre, Jonathan Filée 2004; Yao and O'Donnell 2016).

Pour la suite de cette thèse, je vais me concentrer sur les archées, et leur choix comme modèle d'étude se justifie par leur position dans l'arbre phylogénétique et leur lien de parenté avec les eucaryotes. La machinerie de réplication et de réparation de l'ADN chez les archées est semblable à celle rencontrée chez les eucaryotes, mais en plus simplifiée (Raymann et al. 2014) (Samson et al. 2008), ce qui permet une avancée plus rapide et une transposition des connaissances aux eucaryotes. De plus, les archées ont été capables de s'adapter à un large panel d'environnements extrêmes, ce qui leur confère des caractéristiques intéressantes aussi bien pour la médecine, les biotechnologies, que notre compréhension du vivant.

2) LES ARCHEES

Diversité des archées

De nombreuses archées ont été découvertes (Fig. 2), et leur présence est ubiquitaire. Elles peuvent contribuer jusqu'à 20% de la biomasse totale marine (DeLong and Pace 2001).

Habitat

On retrouve des archées aussi bien dans des milieux extrêmes (pH, température, pression, concentration en sel...) que dans la terre, la flore commensale humaine ou dans le tractus intestinal. Ainsi, *Pyrolobus fumari*, une archée hyperthermophile, détient le record de croissance à 113°C (Fig. 3a). *Haloferax volcanii*, une archée halophile, vit dans les lacs salés à 20% de sel (masse volumique) (Fig. 3b), contre 3,5% pour l'eau de mer. *Sulfolobus acidocaldarius*, une archée acidophile, vit dans des environnements extrêmement acides (pH = 2) et à 80°C (Rothschild and Mancinelli 2011) (Fig. 3c). Il existe aussi des organismes xérophiles (qui aiment les milieux pauvres en eau), alcalinophiles (adaptées aux environnements basiques (pH >10)) et psychrophiles (adaptées aux les températures basses), dont le record est de -20°C grâce à une concentration en sel élevée dans le cytoplasme, évitant ainsi à la cellule de geler (Clarke et al. 2013).

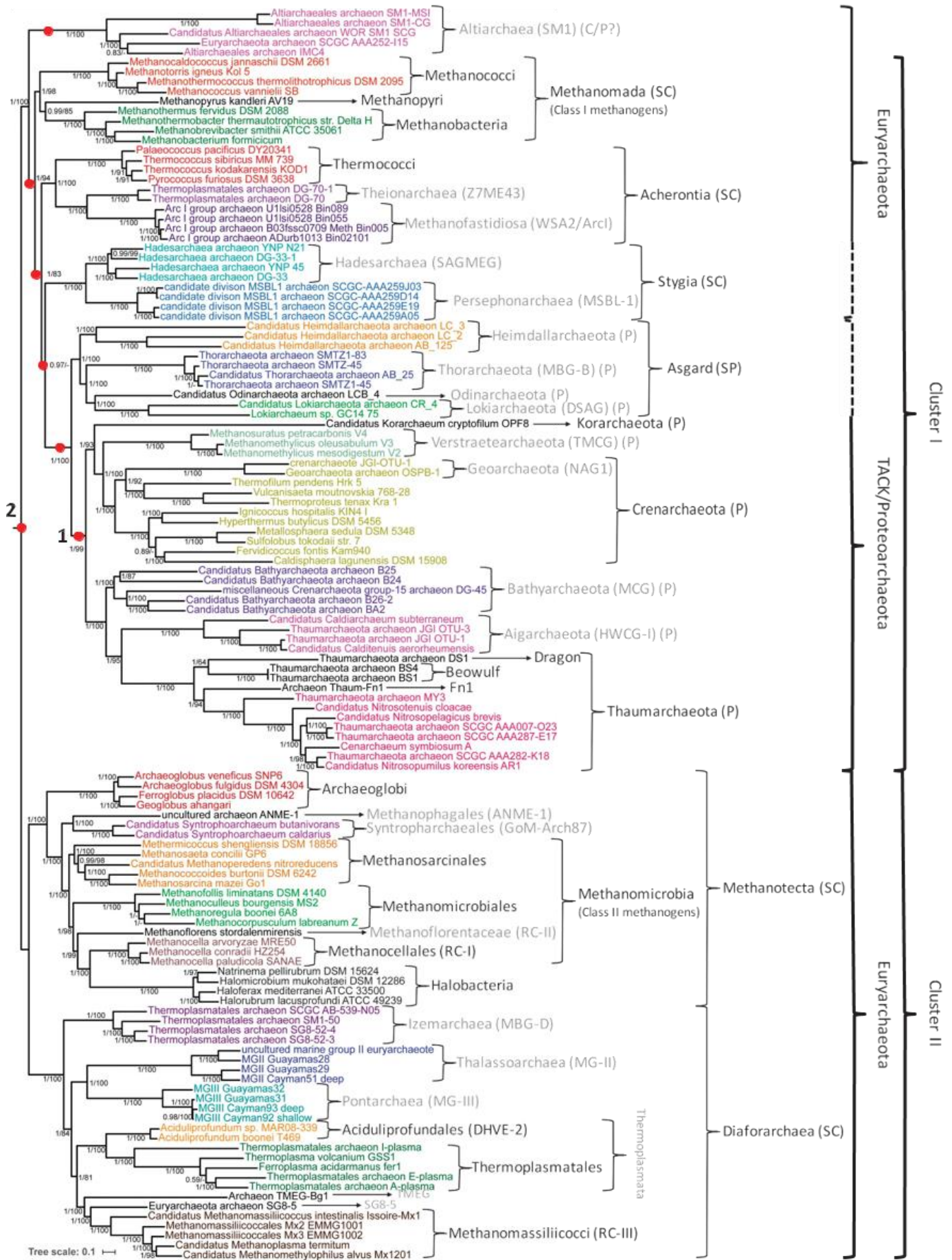


Figure 2 : Arbre phylogénétique centré sur les archées selon Adam (Adam et al. 2017).

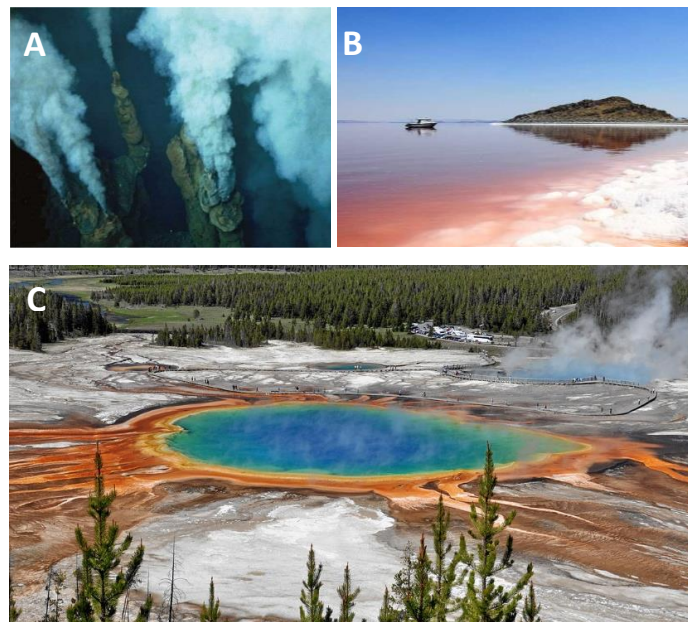


Figure 3 : Différents milieux extrêmes où l'on rencontre des archées. (A) Cheminée hydrothermale le long de la dorsale océanique à plus de 2500m de profondeur (300 atm de pression) (îles Tonga) par ifremer. (B) Lac salé dans le nord de l'Utah (Etats-Unis) par ZED PRODUCTIONS. (C) Source chaude acide (pH =2) Parc national Yellowstone (Etats-Unis) par James St. John de Newark, Ohio — Flickr.

Les archées présentent ainsi une incroyable capacité d'adaptation aux environnements extrêmes. Un trait particulièrement intéressant en biotechnologie, car de nombreuses applications découlent des archées (ou de leurs protéines), capables de résister à des conditions particulières de travail (ex : la biolixiviation pour le traitement des minerais (Rawlings and Johnson 2007), la bioremédiation pour la décontamination des sols, en laboratoire pour les réactions de PCR...).

Les récentes études concernant le microbiote intestinal révèlent la présence d'archées, quasiment exclusivement méthanogènes. Bien qu'étant minoritaires, leur impact sur la santé humaine n'est pas négligeable. Ces archées vivent en symbiose avec les bactéries et participent à l'évolution du microbiote, aussi bien par des transferts horizontaux de gènes que dans la dégradation de déchets métaboliques des bactéries. Tout comme les bactéries, la diversité en archée du microbiote est influencée par le régime alimentaire. Ainsi, bien que les archées ne soient pas pathogènes, la présence de certaines d'entre elles peut avoir un effet bénéfique ou délétère sur la santé humaine (Lurie-Weinberger and Gophna 2015; Moissl-Eichinger et al. 2018).

Morphologie et structure cellulaire

Bien que la plupart des archées possèdent des formes « classiques » (tels les bacilles, coques, vibrio), que l'on retrouve également chez les bactéries, il existe quelques particularités morphologiques. Un exemple des différentes formes retrouvées chez les archées est montré figure 4.

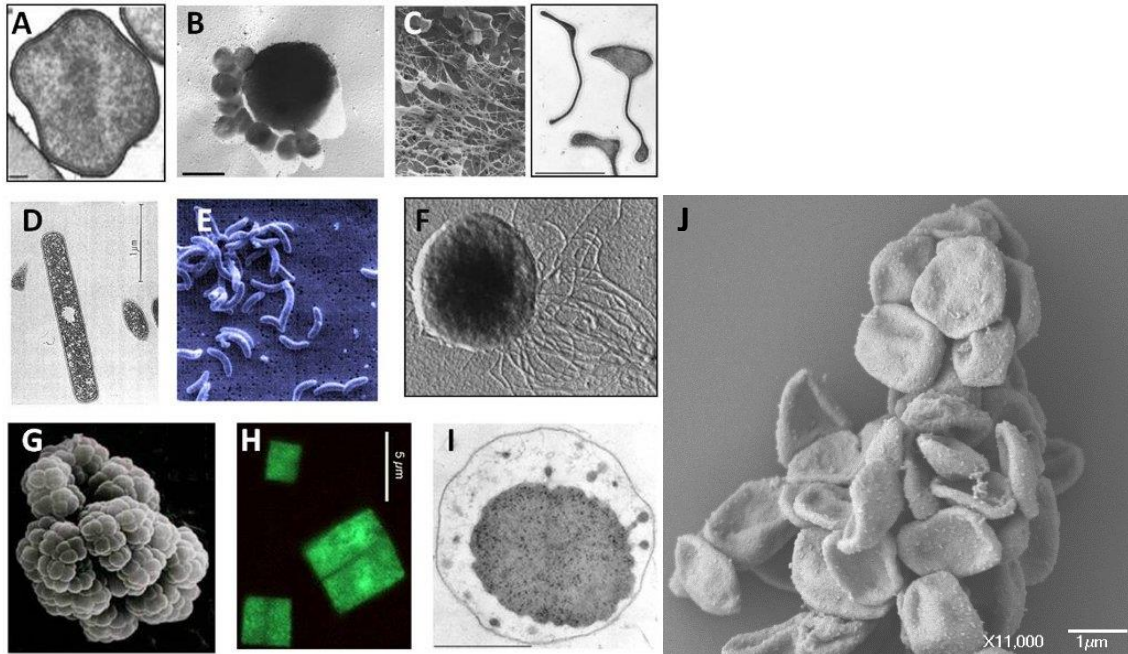


Figure 4 : Exemple des différentes formes retrouvées chez les archées. (A) *Sulfolobus* (« le lobe de soufre »); (B) *Ignococcus* (« la coque de feu ») et son symbionte, *Nanoarchaeum equitans* (« l'archée naine cavalière ») © H. Huber, M. Hohn, R. Rachel & K. O. Stetter, Univ. Regensburg, Allemagne; (C) *Pyrodictium* (« le filet de feu ») © R. Rachel; (D) *Nitrosopumilus* (« le petit qui nitrifie »); (E) *Desulfovibrio* (« la virgule qui réduit le soufre »); (F) *Pyrococcus abyssi* (« la coque de feu des abysses »), où sont visibles les flagelles; (G) *Methanosarcina* (« le paquet de méthane ») © Whitehead Institute Center of Genome Research; (H) *Haloquadratum* (« le carré salé »), © Bolhuis *et al.*, 2004; (I) *Ignococcus*. On observe la membrane extérieure, qui délimite un large espace périplasmique où transitent des vésicules, puis la membrane interne qui délimite le cytoplasme © Huber *et al.*, 2006. (J) *Haloferax volcanii* © Naor *et al.*

Source : <http://edu.mnhn.fr/mod/page/view.php?id=1596>

Certaines archées possèdent un flagelle, appelé archaellum (S. V. Albers and Jarrell 2018). L'article cité insiste sur l'intérêt du nom « archaellum », plutôt que flagelle, car leurs structures et leurs compositions n'ont rien de comparable bien qu'ils possèdent en commun leur fonction d'organe de motilité.

Malgré leur diversité métabolique, de condition de vie, et de forme, il existe des constantes dans le fonctionnement des archées. La paroi cellulaire est composée d'une couche S (S layer) de glycoprotéines associées à la membrane plasmique, d'une épaisseur comprise entre 5 et 25 nm, qui aident au maintien de la morphologie cellulaire et protègent la cellule contre les chocs osmotiques (S.-V. Albers and Meyer 2011). La membrane cellulaire est composée d'un assemblage de bicouche et monocouche lipidique, dans laquelle les lipides contiennent un polymère isoprénique lié au glycérol par une liaison éther (Fig. 5) (Gottlieb et al. 2016).

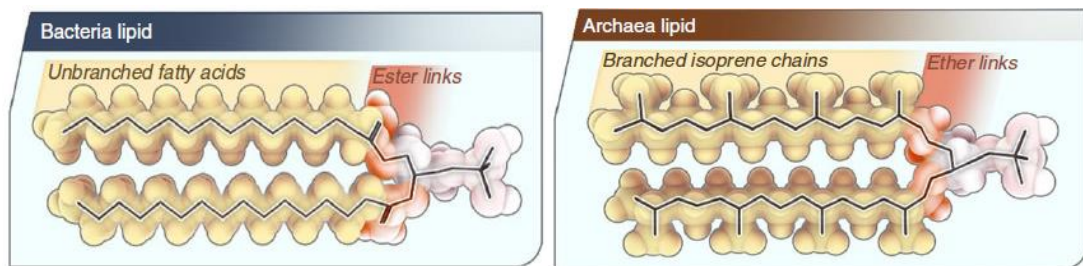


Figure 5 : Structure de la membrane plasmique chez les bactéries et chez les archées, selon (Gottlieb et al. 2016).

La place des archées dans le domaine du vivant ainsi que leurs caractéristiques générales étant présentées, je vais maintenant m'intéresser au processus de réplication chez ces organismes, qui a été au cœur de mon travail de recherche.

II] LA REPLICATION

1) GENERALITES

La réplication correspond au processus par lequel la cellule copie son génome afin de le transmettre aux deux cellules filles. Ce processus est fondamental dans la vie d'une cellule, car des défauts de réplication peuvent entraîner des mutations qui seront transmises à l'ensemble de la descendance, voire entraîner la mort de la cellule. Il a été établi chez différents organismes, des bactéries aux eucaryotes, que des défauts de réplication de l'ADN induisent une augmentation de la fréquence de recombinaison, et sont ainsi une source importante de réarrangements chromosomiques. De plus, des liens entre défauts de réplication et cancer ont désormais été identifiés (Magdalou et al. 2014). Ainsi comprendre les mécanismes moléculaires préservant l'intégrité du génome est un enjeu majeur.

Les mécanismes généraux de la réplication sont conservés dans l'ensemble des domaines du vivant, et seraient apparus deux fois au cours de l'évolution (cf. I] 1) LUCA et LARKA). Bien que ces mécanismes soient similaires, les protéines réalisant les différentes fonctions nécessaires à la réplication sont différentes dans les trois domaines du vivant. Nous avons ainsi, pour les trois domaines, des protéines jouant des rôles identiques, possédant des structures et des séquences plus ou moins différentes, avec la nuance que les protéines retrouvées chez les archées et les eucaryotes présentent de fortes similarités (Raymann et al. 2014). Les mécanismes de réplication archéens sont considérés comme étant plus simples que ceux présents chez les eucaryotes, voire même ancestraux (cf. I] 1). Pour la suite de mon mémoire de thèse, je m'intéresserai aux protéines archéennes de la réplication. Un résumé de toutes les protéines décrites dans cette partie est disponible Tableau 2, qui compare ces protéines à celles rencontrées dans les deux autres domaines du vivant (Kelman and Kelman 2014).

Classiquement, la réplication se décompose en trois grandes étapes majeures :

- L'initiation de la réplication, qui correspond aux mécanismes permettant le démarrage de la réplication. Elle comprend la reconnaissance de séquences particulières par des protéines d'initiation, ainsi que l'ouverture de la double hélice d'ADN, permettant à la machinerie de réplication de s'assembler sur l'ADN.
- L'élongation, qui correspond à l'étape de synthèse de l'ADN par la machinerie de réplication au niveau des fourches de réplication.
- La terminaison, qui correspond à l'arrêt de la machinerie de réplication et sa dissociation de l'ADN.

La réplication est dite semi-conservative : elle permet d'obtenir deux molécules d'ADN génomique, chacune constituée d'un brin parental et d'un brin néosynthétisé.

Les origines de réplication

La réplication commence à une séquence spécifique fixe qui s'appelle l'origine de réplication (à deux exceptions connus prés, chez les archées). Cette séquence est située dans une région intergénique, riche en A-T, et entourée par des séquences ORB (*Origin Recognition Boxes*), qui correspondent à des motifs répétés, d'une quinzaine de nucléotides, reconnus par les protéines de reconnaissance des origines (OBP) (Matsunaga et al. 2001, 2007; Wu et al. 2014; Samson and Bell 2016). Généralement, les gènes codant des OBP sont situés à proximité des origines de réplication. Les eucaryotes possèdent de nombreuses origines de réplication sur des chromosomes linéaires, et les bactéries une origine unique sur un chromosome circulaire. Les archées correspondent à un modèle hybride entre les deux : leur chromosome est circulaire, et le nombre d'origine varie selon les familles. Certaines archées ne possèdent qu'une origine de réplication, comme par exemple *P.abysyi*, chez qui la première origine de réplication archéenne a été identifiée (Mylykallio et al. 2000), mais la majorité des archées découvertes à ce jour en possèdent plusieurs, comme par exemple *H.volcanii* qui en possède trois (Norais et al. 2007; Hawkins et al. 2013). (Tableau 1).

Phylum	Organism	No. of replication origin
Euryarcheota	<i>Pyrococcus abyssi</i>	1
	<i>Haloferax volcanii</i>	3
	<i>Haloferax mediterranei</i>	2
	<i>Archaeoglobus fulgibus</i>	1
	<i>Halobacterium</i> sp. NRC1	4
	<i>Haloarcula hispanica</i>	2
	<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	1
	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	3
Crenarcheota	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	3
	<i>Sulfolobus islandicus</i>	3
	<i>Pyrobaculum calidifontis</i>	4
	<i>Aeropyrum pernix</i>	At least 2
Thaumarcheota	<i>Nitrosopumilus maritimus</i>	1

Tableau 1 : Aperçu du nombre d'origines de réplication retrouvées chez les différentes familles d'archées, selon Lestini *et al*, 2015 (Lestini, Delpech, and Mylykallio 2015).

L'initiation de la réplication

L'initiation de la réplication s'effectue par la reconnaissance des ORB par la protéine d'initiation Orc1/Cdc6 (*Origin recognition complex / Cell division cycle*) et/ou les protéines Whip (*Winged helix initiator protein*). Les protéines Orc1/Cdc6 possèdent des homologies de séquence avec les protéines eucaryotes Orc1 et Cdc6 dont le rôle est, respectivement, de reconnaître les ORB et de charger l'hélicase réplicative. Les protéines Whip partagent des similarités de séquence avec la protéine eucaryote Cdt1 et seraient issue d'un élément extra-chromosomique capturé, probablement d'origine virale. Ces dernières sont spécifiques des crénarchées (Robinson and Bell 2007). En général, les génomes archéens contiennent entre 1 et 9 gènes *orc1/cdc6* (Barry and Bell 2006). Ces protéines vont localement séparer les deux brins de l'ADN grâce à leur activité ATPasique et ainsi former l'œil de réplication nécessaire au chargement de l'hélicase réplicative (Samson et al. 2016). L'hélicase réplicative correspond à la protéine MCM (*mini chromosome maintenance*), qui est un homo-hexamère dont le rôle est de séparer les deux brins d'ADN matrice en amont de la fourche de réplication. La réplication étant bidirectionnelle, deux hélicases sont chargées dans l'œil de réplication, formant ainsi le complexe de pré-réplication.

L'œil de réplication s'ouvre de plus en plus grâce à l'action des hélicases. Des facteurs de réplication supplémentaires vont venir se fixer à l'œil de réplication : le complexe protéique GINS et la protéine Cdc45. Le complexe GINS est un tétramère qui interagit à la fois avec MCM, l'ADN polymérase, Cdc45, la primase et PCNA (Barry and Bell 2006; Nagata et al. 2017). Il correspond à une plateforme de recrutement et d'organisation de la machinerie de réplication, et est souvent indispensable à la viabilité cellulaire. La protéine Cdc45 ne possède pas encore un rôle clair, et sa délétion n'entraîne pas de défauts majeurs de la réplication (Burkhart et al. 2017). Les protéines de liaison à l'ADN simple brin SSB (*Single Stranded DNA Binding protein*) vont venir protéger l'ADN simple brin généré par MCM (Dickey et al. 2008). Chez la majorité des archées, les SSB correspondent aux protéines RPA (*replication protein A*), dont la protéine ressemble à la protéine eucaryote. L'exception correspond aux archées hyperthermophiles du phylum crenarchaeota (par exemple les *Sulfolobus*), chez qui l'on parle de SSB car la structure de la protéine ressemble aux SSB bactériennes (Raymann et al. 2014). Les protéines SSB permettent d'éviter que l'ADN simple brin ne soit attaqué par des endonucléases, modifié chimiquement, et empêchent la formation de structure secondaire, favorisant ainsi la processivité de l'ADN polymérase. Il existe généralement plusieurs homologues de RPA, et tous ne sont pas essentiels. Chez les *Sulfolobus*, il n'existe qu'un seul homologue connu de SSB, qui n'est pas essentiel (Suzuki and Kurosawa 2019). L'ensemble (Cdc6, MCM, GINS, Cdc45, RPA) forme le complexe de pré-initiation.

L'élongation

Une fois le complexe de pré-initiation formé, une primase va venir se charger de chaque côté de l'œil de réplication, formant deux fourches de réplication actives. La primase est composée de deux sous unités (PriS et PriL) et synthétise des amorces ARN d'une longueur d'environ 15 nucléotides (Lao-Sirieix and Bell 2004), indispensables à l'activité de l'ADN polymérase. La protéine RFC (*Replication Factor C*) est une ATPase permettant le chargement de la protéine PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), et s'en dissocie immédiatement après sa fixation à l'ADN (O'Donnell et al. 2013). PCNA, qui est le facteur de processivité, est un homo-trimère en forme d'anneau. PCNA a également pour rôle la modulation de la réplication par association avec différents facteurs. Les protéines interagissant avec PCNA arborent généralement un motif PIP (*PCNA Interacting Protein*) (Ishino and Ishino 2012; Winter and Bunting 2012), ou un motif PIP-like, dans lequel une glutamine normalement conservée fait défaut. Les protéines abordant le motif PIP-like contiennent une région riche en lysine créant une région basique, qui les aiderait à compenser l'action de la glutamine manquante par des interactions électrostatiques (Hogrel et al. 2018).

Au niveau de chaque fourche de réplication, les deux brins d'ADN ne sont pas synthétisés de la même manière, de par la nature antiparallèle de l'ADN et la capacité des ADN polymérases à ne synthétiser l'ADN que dans le sens 5'->3'. Un brin est synthétisé de façon continue (*leading strand*), car la polymérase se déplace dans le même sens que la fourche de réplication, alors que l'autre brin est synthétisé de façon discontinue (*lagging strand*, ou brin « retardé ») (Fig. 7), car la polymérase se déplace en sens opposé au sens de progression de la fourche. La synthèse discontinue crée une suite de fragments d'ADN, appelés fragments d'Okazaki, qui seront maturés pour obtenir un brin néosynthétisé continu.

Les euryarchées possèdent au moins une polymérase de type B et une polymérase de type D (Berquist et al. 2007) (Henneke et al. 2005), alors que les crénaarchées possèdent deux ou trois polymérases de type B (Iwai et al. 2000; Raymann et al. 2014). Dans les cas où plus d'une polymérase est présente, cela soulève la question quant à une possible spécificité de brin (Rouillon et al. 2007), comme cela est observé chez les eucaryotes, ainsi que la question de la polymérase répliquative. Chez les crénaarchées, qui ne possèdent que des ADN polymérases de type B, il est fort probable que la polymérase répliquative soit de type B, mais chez les autres archées la polymérase B n'est pas toujours essentielle (Berquist, DasSarma, and DasSarma 2007). Chez l'archée *Thermococcus kodakarensis*, la polymérase B peut être inactivée sans effet sur la viabilité ou la croissance, alors que la polymérase D est essentielle (Kushida et al. 2019). Toutes les familles de polymérase possèdent une activité de correction. Les polymérases possèdent comme substrat

des nucléotides triphosphates, et catalysent une réaction d'estérification entre l'extrémité libre 3' OH d'un fragment d'ADN et le nucléotide ajouté, créant une liaison phosphodiester.

Dans le cas des euryarchées, il semblerait que la polymérase D initie la synthèse de l'ADN à la fois sur le brin continu et le brin discontinu, et potentiellement échangerait sa place avec la polymérase B sur le brin continu (Henneke et al. 2005; Rouillon et al. 2007).

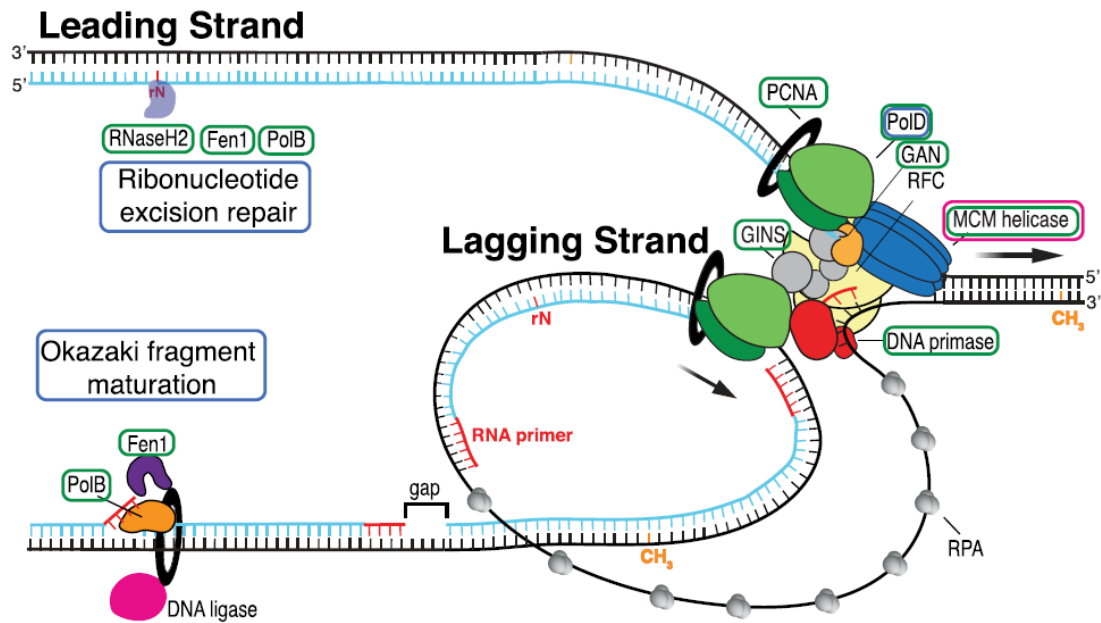


Figure 7 : Fourche de réplication archéenne selon Zatopek (Zatopek, Gardner, and Kelman 2018)

Maturation des fragments d'Okazaki

Sur le brin retardé, les fragments d'Okazaki vont devoir ensuite être maturés afin de former un brin continu d'ADN. Toutes les amorces ARN générées par la primase vont devoir être retirées et remplacées par de l'ADN. Pour cela, une polymérase, des nucléases et des ligases vont être recrutées. Dans un premier temps, la nucléase Fen1 (*Flap endonuclease 1*) va être recrutée afin d'éliminer les amorces. PCNA possède un rôle important car il interagit avec tous les composants du complexe de maturation, permettant un recrutement séquentiel des protéines (Greenough et al. 2015; Beattie and Bell 2012) l'amorce ARN de l'ADN matrice, menant à la formation d'une queue flottante et permettant la fixation de l'endonucléase Fen1. Fen 1 va couper l'amorce, et l'ADN polymérase B va synthétiser l'ADN pour combler le trou (Henneke 2012; Cannone

et al. 2015; W. Burkhart et al. 2017). Une ADN ligase va ensuite catalyser la liaison entre les différents fragments d'Okazaki.

La terminaison

Quand la réplication est terminée, les fourches se rencontrent et la machinerie de réplication doit se dissocier de l'ADN. Chez les bactéries, qui possèdent aussi un chromosome circulaire, les fourches de réplication se rencontrent au niveau de la région de terminaison. On trouve au niveau de cette région des sites d'arrêt de la réplication permettant spécifiquement l'arrêt des fourches progressant dans le sens des aiguilles d'une montre, ou dans le sens inverse (Kelman and Kelman 2014). Cela assure une réplication précise du chromosome en évitant que les deux fourches ne se croisent sans s'arrêter, évitant une sur-réplication du génome. Il semblerait que chez les archées, il n'y ait pas de région terminale, et que la rencontre de deux fourches de réplication se fasse de manière aléatoire, sans localisation particulière, comme cela semble également être le cas chez les eucaryotes (Duggin, Dubarry, and Bell 2011).

Chez les bactéries, il existe des sites *dif*, dont la fonction est de recruter des recombinases Xer afin d'éviter les dimères de chromosomes en cas de nombre impaire d'évènements de recombinaison. Les archées contiennent des séquences *dif* similaires à celles trouvées chez les bactéries (Duggin, Dubarry, and Bell 2011), mais dont la localisation varie selon les espèces. On retrouve également des homologues de Xer, laissant penser que les mécanismes de terminaison concernant la recombinaison chez les archées ressembleraient à ce que l'on trouve chez les bactéries (Cortez et al. 2010).

Attribute	Bacteria	Eukarya	Archaea	
			Euryarchaea	Crenarchaea
Chromosome	Circular	Linear	Circular	Circular
Replication origin	Single	Multiple	Single or Multiple	Single or Multiple
Prereplication complex (pre-RC)				
Origin recognition	DnaA	ORC	Cdc6 ^c	Cdc6 WhiP
Helicase	DnaB	MCM	MCM	MCM
Helicase loader	DnaC	Cdc6 Cdt1	Cdc6	Cdc6
Preinitiation complex (pre-IC)				
Cdc45	-	Cdc45	Cdc45	Cdc45
GINS	-	GINS	GINS	GINS
Single-stranded DNA binding protein (SSB)	SSB	RPA	RPA	SSB
Elongation complex				
Primase	DnaG	Pol α /primase	Primase	Primase
Sliding clamp	β -subunit	PCNA	PCNA	PCNA
Clamp loader	τ -complex	RFC	RFC	RFC
DNA polymerase	PolC	PolB	PolB/PolD	PolB
Okazaki fragment maturation				
Primer removal	PolI	FenI	FenI	FenI
Gap filling	PolI	PolB	PolB/PolD	PolB
DNA ligase	NAD ⁺ -dependent	ATP-dependent	ATP-dependent	ATP-dependent

Tableau 2 : Tableau résumé des enzymes impliquées dans la réplication. Les protéines et les caractéristiques bactériennes sont en rouge, les protéines et les caractéristiques eucaryotes sont en bleu, et les protéines et les caractéristiques spécifiques aux archées sont en vert. Selon Kelman, 2014 (Kelman and Kelman 2014).

2) DISCUSSION SUR LA REGULATION DE L'INITIATION

Dans le cas des archées possédant plusieurs origines de réplication, on constate que ces origines ne sont pas réparties uniformément le long du chromosome. Les fourches de réplication se déplaçant à vitesse identique (Duggin, Dubarry, and Bell 2011), cela implique la présence de mécanismes de régulation, soit pour l'initiation, soit pour la terminaison (Lestini, Delpech, and Myllykallio 2015). Par exemple, chez les archées *Sulfolobus solfataricus* et *Sulfolobus acidocaldarius*, qui possèdent chacune trois origines de réplication, l'activation des origines se fait de manière synchrone (Coker et al. 2009). A cela s'ajoute le fait que certaines archées étant polyploïdes, il existe potentiellement des mécanismes de régulation de l'initiation de la réplication à l'échelle des différentes copies du chromosome. Les séquences de ces origines de réplication (ORB) ne sont pas toutes identiques (Wu et al. 2012), est-ce un moyen pour la cellule de réguler différemment l'activation de ses origines ?

Beaucoup d'études ont déjà été réalisées dans le but de comprendre comment la cellule régule l'activation de ses origines de réplication. Comme vu dans le chapitre II] 1) – l'initiation de la réplication est la première étape de la réplication qui consiste en la liaison des OBP sur les ORB.

Une méthode permettant de déterminer quel est le rôle de chaque élément est leur délétion. Ainsi, plusieurs études ont visé à supprimer les origines de réplication ou les OBPs, menant à des résultats étonnants et parfois très différents d'une espèce à l'autre, indiquant une régulation complexe de l'initiation.

Le nombre de gènes *orc1/cdc6* n'est pas corrélé avec le nombre d'origine de réplication. Souvent, ces gènes sont situés à proximité des origines de réplication (Wu et al. 2012). Par exemple dans le cas de l'archée *Halobacterium salinarum* qui possède quatre origines de réplication, seulement deux gènes *orc1/cdc6* sur dix sont situés à proximité des origines de réplication. Ces deux OBPs se lient spécifiquement à l'origine située à proximité. De plus, sept des dix analogues de Orc1/Cdc6 ne sont pas essentiels à la viabilité cellulaire, cela suggère la présence de mécanismes complexes de régulation de l'initiation, qui peuvent être impliqués dans la régulation de la croissance en fonction des conditions de culture ou du stress cellulaire (Coker et al. 2009).

Les archées de la famille des *Sulfolobus* possèdent trois origines de réplication (*OriC1* à 3), trois gènes *orc1/cdc6* (*Orc1-1* à 3) et un gène *whip* (cf. II] 1)). Les gènes *orc1-1*, *orc1-3*, et *whip* sont chacun situés près d'une origine de réplication. Chez *S. solfataricus*, les protéines Orc1-1, Orc1-2 et Whip sont capables de se lier à chaque origine, et la protéine Orc1-3 est capable de se lier aux origines *OriC2* et *OriC3*. On ne sait cependant pas si la liaison de n'importe quelle protéine Orc1/Cdc6 est suffisante pour activer l'origine. Chez *S. islandicus*, aucun des trois gènes *Orc1/Cdc6* n'est essentiel, et leur délétion n'entraîne pas de retard de croissance, bien qu'au moins un soit nécessaire pour la viabilité cellulaire. *OriC1* est dépendante pour son activation de la protéine Orc1-1, *OriC2* de Orc1-3, et *OriC3* de la protéine Whip (Samson et al. 2013). Chez *S. acidocaldarius*, les trois origines de réplication sont utilisées dans chaque cellule et à chaque division, avec une activation coordonnée des deux premières, alors que la troisième semble avoir moins de contraintes temporelles (Gristwood et al. 2012).

Que se passe-t-il lorsque l'on supprime le couple origine/OBP ? C'est la question que se sont posée Wu et al chez *H. hispanica*, dont le génome possède deux origines de réplication. La délétion d'une origine de réplication est viable, mais la délétion de l'OBP associée entraîne de sévères problèmes de croissance, indiquant un rôle supplémentaire des OBP indépendant de la liaison aux ORB et MCM (Wu et al. 2012). De plus, au moins une origine de réplication est nécessaire à la viabilité cellulaire, indiquant leur importance dans l'initiation de la réplication. C'est également le cas chez *H. mediterranei* (Yang et al. 2015).

Mais cela n'est pas vrai chez toutes les archées, comme le montrent les études réalisées chez *Haloferax volcanii* (Hawkins et al. 2013) et *Thermococcus kodakarensis* (Gehring et al. 2017).

Les expériences de délétion des origines qui ont été effectuées chez *H. volcanii*, qui possède quatre origines de réplication, montrent que le temps de génération est corrélé aux origines supprimées. La délétion d'une origine de réplication entraîne un retard de croissance, et le résultat de la délétion de plusieurs origines n'est pas prévisible : certaines combinaisons entraînent un retard de croissance, alors que d'autres réduisent le temps de génération. De plus, cet organisme est capable de survivre à la délétion de l'ensemble de ses origines de réplication, et pousse deux fois plus vite que la souche sauvage, sans par ailleurs présenter de défauts de croissance (Hawkins et al. 2013). Des études de MFA (*Marker Frequency Analysis*) ne montrent aucune activation d'une origine dormante spécifique, contrairement à l'archée *Haloferax mediterranei* (Yang et al. 2015). Cela suggère une initiation aléatoire répartie uniformément sur l'ensemble du génome au sein d'une population cellulaire. Les auteurs proposent que l'initiation de la réplication se fasse à partir d'intermédiaires de recombinaison, comme cela est observé chez certains mutants de la bactérie *E. coli*. On parle alors de Réplication Dépendante de la Recombinaison, ou RDR (Asai, Bates, and Kogoma 1994). La souche profiterait de la réparation par recombinaison homologue de lésions spontanées de l'ADN pour initier la réplication à partir de ces intermédiaires de recombinaison, qui ressemblent à une fourche de réplication. Chez la bactérie, une protéine clef de ce processus est l'hélicase PriA, responsable du chargement d'un réplisome sur de tels intermédiaires de recombinaison. Les lésions étant aléatoires, cette hypothèse peut parfaitement expliquer le fait de ne voir aucune région privilégiée du génome comme région d'initiation de la réplication dans cette souche. Afin de tester cette hypothèse, les auteurs ont délété la protéine RadA, recombinase majeure responsable de la formation des intermédiaires de recombinaison sur lesquels assembler un réplisome, et montré que cette délétion est létale dans une souche ne possédant plus d'origine de réplication (Hawkins et al. 2013). Une nuance est cependant à apporter à ce résultat : un mutant $\Delta radA$ présente un retard de croissance important (Woods and Dyll-Smith 1997). Il est donc possible que cette perte de viabilité s'explique par un besoin accru de la recombinaison homologue dans un contexte sans origine de réplication sans impliquer directement que la recombinaison homologue permette directement la réplication. A noter également l'absence de protéine homologue à PriA chez les archées, cela n'excluant pas la possibilité qu'une protéine spécifique (qui reste à identifier) permette un chargement du réplisome sur des intermédiaires de recombinaison.

Une étude similaire a été réalisée avec l'archée *Thermococcus kodakarensis*, dans laquelle l'origine de réplication et le gène *Orc1/Cdc6* ont été supprimés. La souche résultante ne possède pas de défaut de croissance. Chez *T. kodakarensis*, la délétion de RadA n'est pas viable, suggérant l'utilisation de la recombinaison comme mécanisme d'initiation de la réplication dans un contexte sauvage. Une analyse en MFA ne montre pas de zone préférentielle d'initiation de la réplication, même dans la souche sauvage. Les auteurs proposent que la souche utilise la RDR dans un contexte sauvage, raison pour laquelle il est possible de supprimer à la fois l'origine de réplication et le gène *orc1/cdc6* (Gehring et al. 2017).

H. volcanii et *T. kodakarensis* sont deux modèles d'étude extrêmement intéressants et offrent un contexte particulier d'étude de la réplication car ils possèdent des mécanismes d'initiation de la réplication indépendant des origines de réplication. Ce sont également deux organismes polyploïdes. Comprendre la régulation de l'initiation de la réplication chez ces organismes, et comprendre comment les contextes génétiques et/ou environnementaux influent sur l'initiation de la réplication et sa régulation apporteraient des connaissances indispensables à notre compréhension de ces mécanismes. C'est pourquoi nous avons souhaité étudier la dynamique de réplication chez *H. volcanii*.

3) HALOFERAX VOLCANII EN TANT QUE MODELE D'ETUDE

Haloferax volcanii est une archée appartenant au phylum des euryarchées. Elle a été isolée à partir de sédiments de mer morte en 1970 par Benjamin Volcani et décrite plus précisément en 1975 (Mullakhanbhai and Larsen 1975), mais on la retrouve également dans les lacs salés.

H. volcanii est une archée aérobie et mésophile, dont la température optimale de croissance est de 45°C. C'est une archée halophile stricte, c'est-à-dire qu'elle a besoin d'une concentration élevée en sels (concentration optimale de 2,5 M) et s'est adaptée à cet environnement salé en modifiant sa concentration intracellulaire de sel et en adaptant la biochimie de ses protéines. Son temps de génération est de deux heures. Enfin, *H.volcanii* est pléiomorphe, en forme de disque plat ou de bâtonnet, d'environ 1 µm x 3 µm, et 0,5 µm d'épaisseur (Mullakhanbhai and Larsen 1975).

Le génome de l'isolat sauvage DS2 d'*H. volcanii* se compose d'un chromosome circulaire principal de 2,848 méga-bases ainsi que de trois méga-plasmides : pHV1 (85 kilo-base (kb)), pHV3 (438 kb) et pHV4 (638 kb), et un plasmide pHV2 de 6,4 kb. Il présente un fort taux de GC : 65% (Hartman et al. 2010). La souche couramment utilisée en laboratoire est la souche H26, qui possède la délétion du gène *pyrE2* (Bitan-banin, Ortenberg, and Mevarech 2003), codant l'orotate phosphoribosyltransférase, impliquée dans le métabolisme de synthèse *de novo* de l'uracile et est utilisée comme marqueur de sélection et de contre-sélection. De plus, la souche H26 a été curée du plasmide *pHv2*. Il est important de mentionner que dans la souche de laboratoire couramment utilisée, H26, le plasmide *pHV4* s'est intégré au chromosome. Elle présente donc un génome de 3,48 mégabases comportant non plus trois origines de réplication mais quatre. C'est un organisme polyploïde, qui contient jusqu'à dix-huit copies de son génome en phase exponentielle de croissance (Breuert et al. 2006).

Au niveau des protéines de réplication, il existe chez *H.volcanii* 16 gènes *orc1/cdc6* (Ludt and Soppa 2018), dont certains sont localisés à proximité des origines de réplication sur le chromosome ou les plasmides, et trois sont essentiels. Le grand nombre de gènes *orc1/cdc6* laisse penser à une régulation complexe de l'initiation (Norais et al. 2007), il a été montré par délétion de ces gènes *orc1/cdc6* que l'ensemble de ces gènes influent sur le nombre de copie du génome, certains favorisant un grand nombre de copies, alors que d'autres tendent à diminuer le nombre de copies (Ludt and Soppa 2018). *H.volcanii* ne possède qu'un seul homologue de PCNA, qui est essentiel à la viabilité (Winter et al. 2009). Elle possède trois SSB : RPA 1, RPA 2 et RPA 3. RPA 1 et 3 ne sont pas essentielles, mais leur délétion simultanée n'est pas viable, suggérant qu'elles partagent un rôle commun. RPA 2 est essentielle, et sa surexpression entraîne une résistance améliorée de la souche aux agents génotoxiques, de sorte que RPA2 semble avoir un rôle prépondérant lors de la réplication (Skowyra and MacNeill 2012).

Malgré la polypléidie, les manipulations génétiques chez cet organisme sont possibles car *H.volcanii* possède un mécanisme de conversion génique, défini comme le transfert non réciproque d'information entre deux séquences homologues, qui va homogénéiser les allèles au sein de son génome et ainsi transformer les souches hétérozygotes en souches homozygotes (Lange et al. 2011).

Il existe chez *H. volcanii* de nombreux outils génétiques à notre disposition : la capacité à l'insertion et la délétion de séquences *via* la recombinaison homologue (Bitan-banin, Ortenberg, and Mevarech 2003), l'inactivation spécifique d'un gène grâce au système CRISPR (Stachler et al. 2019), la présence de vecteurs navettes et de marqueurs de sélection (Bitan-banin, Ortenberg, and Mevarech 2003) faisant de *H. volcanii* un modèle d'étude pertinent. Ces outils permettent notamment l'insertion et la délétion de gènes, mais aussi le marquage des protéines (Zatopek, Gardner, and Kelman 2018). De plus, le caractère aérobe d'*H.volcanii* permet l'utilisation d'une protéine fluorescente verte (GFP). Cependant, la forte concentration en sel présente à l'intérieur du cytoplasme impose l'utilisation d'un variant particulier de la GFP : le variant smRS-GFP. Cette GFP est capable d'être soluble même à forte concentration de sels (Reuter and Maupin-Furlow 2004), et a pu être améliorée afin d'obtenir un fluorophore possédant une fluorescence 3,3 fois supérieure (mGFP6) (Born and Pfeifer 2019).

Maintenant que l'on connaît les caractéristiques d'*H. volcanii* utiles à l'étude de la réplication et de son initiation, je vais m'intéresser à comment les utiliser pour obtenir de nouvelles connaissances, notamment grâce à la microscopie.

III] MICROSCOPIE

Je décrirai dans un premier temps les contraintes biologiques liées à l'étude de la réplication qui ont guidées mon choix du type de techniques de microscopie utilisées, ainsi que leurs principes. Les types de microscopies photoniques (optiques) utilisées pendant ma thèse sont la microscopie à contraste interférentiel différentiel (DIC), la microscopie à fluorescence ainsi que de la microscopie super-résolue (SIM). Ce chapitre correspond à une vulgarisation de principes physiques que je ne détaillerai pas. Il a pour vocation d'expliquer de manière générale comment ces techniques fonctionnent, dans le but de pouvoir interpréter les résultats qu'elles fournissent.

Dans un second temps, je détaillerai la façon dont ces deux techniques sont utilisées pour étudier la réplication.

1) CONTRAINTES BIOLOGIQUES ET PRINCIPES DES TECHNIQUES DE MICROSCOPIE ASSOCIEES

Les caractéristiques d'*H. volcanii* nous impose l'utilisation de la microscopie pour son observation. On cherche à observer la cellule dans son ensemble, idéalement vivante, et en grand nombre afin d'avoir un fort pouvoir statistique. Un microscope à champ large équipé d'un module de contraste interférentiel différentiel (DIC) est parfaitement adapté pour ce genre d'étude, car il ne nécessite aucune coloration des cellules pour les observer. Le principe de ce microscope est décrit plus bas.

Le caractère aérobe d' *H. volcanii* nous permet d'utiliser la protéine verte fluorescente GFP comme marqueur (car elle a besoin d'oxygène pour ses modifications post traductionnelles), il nous faut donc également un microscope à fluorescence. L'avantage de la fusion GFP est qu'elle permet l'observation de cellules vivantes avec un suivi à la fois spatial et temporel de l'objet d'étude.

L'utilisation d'un microscope à fluorescence nous permet également d'utiliser n'importe quel type de marquage fluorescent si la condition de cellule vivante n'est pas indispensable, et notamment de l'immunomarquage en utilisant des anticorps secondaires couplés à des fluorophores chimiques.

Cependant, le marquage par fluorescence, qu'il soit fait grâce à une fusion GFP ou par un fluorophore chimique, pose la question de la résolution du microscope, qui correspond à la capacité du microscope à séparer et distinguer deux éléments proches. Or un marquage GFP permet de collecter un signal sur la présence d'une structure à l'échelle de la protéine (de l'ordre du nanomètre), qui est bien inférieure à la résolution qui peut être obtenue avec un microscope photonique (basé sur l'utilisation de la lumière) de l'ordre de la centaine de nanomètres (Fig. 8).

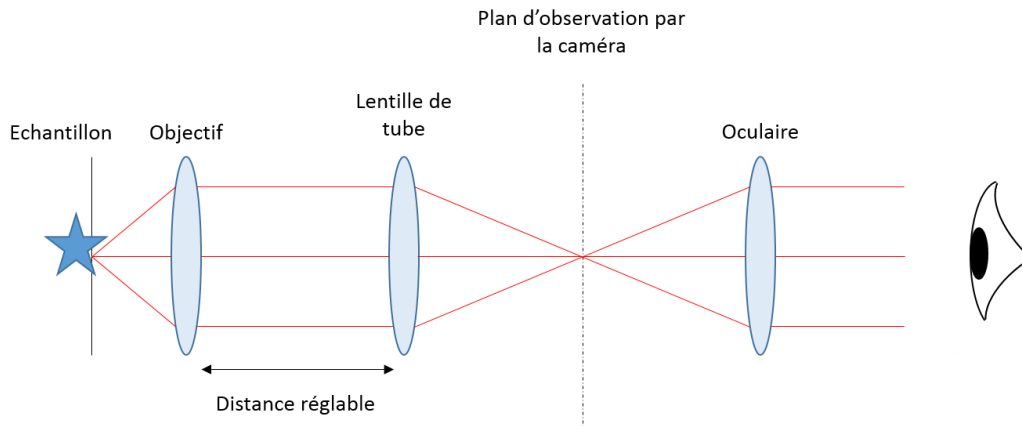


Figure 8 : Schéma du chemin optique dans un microscope.

Les microscopes modernes possèdent une architecture dite « à l'infini », ce qui permet de modifier la distance entre l'objectif et la lentille de tube. Concrètement, cela permet de changer le plan focal sans bouger l'échantillon, et de changer l'objectif du microscope facilement.

La résolution d'un microscope dépend de plusieurs paramètres : de la longueur d'onde utilisée, de l'ouverture numérique de l'objectif, et du nombre de pixels de la caméra. Concernant ce dernier point, les caméras actuelles contiennent suffisamment de pixels pour qu'elles ne soient plus un facteur limitant. La résolution d'un microscope se calcule donc de la manière suivante :

$$R_{xy} = \frac{\lambda}{2NA} \quad \text{et} \quad R_z = \frac{2n\lambda}{NA^2}$$

Avec : R_{xy} la résolution latérale, R_z la résolution verticale, λ la longueur d'onde, n l'indice de réfraction et NA l'ouverture numérique de l'objectif.

Pour une longueur d'onde de 500 nm (\approx GFP), un objectif à huile d'une ouverture numérique de 1.4 (utilisé au laboratoire), on obtient :

$$R_{xy} \sim 200 \text{ nm} \quad \text{et} \quad R_z \sim 800 \text{ nm}$$

Nous connaissons maintenant les limites de notre microscope. Ces limites s'appliquent aussi bien à la microscopie à fluorescence qu'au contraste interférentiel, ces deux éléments étant installés sur le même microscope.

La microscopie à contraste interférentiel différentiel (DIC)

Cette technique utilise les propriétés ondulatoires de la lumière. Les cellules, qui sont transparentes, sont traversées par un rayon lumineux et vont changer sa phase. Ce changement de phase est dû à la différence de composition du cytoplasme par rapport au milieu extracellulaire (organites, concentration en ions...). En prenant une lumière polarisée à 45° et en la séparant en deux (un faisceau référant et un faisceau sonde), les deux faisceaux vont traverser l'échantillon, séparés dans le plan focal par une distance voisine de la résolution du microscope. Les deux faisceaux vont potentiellement subir un déphasage différent, et vont être recombinaés, et interférer. Lorsque la traversée de l'échantillon n'induit pas de différence entre les deux faisceaux, ils interfèrent de manière destructive, provoquant l'extinction du signal. A l'inverse, si l'échantillon induit une différence de phase, une interférence constructive a lieu et un signal est collecté. Cette technique est donc sensible à la modification de la phase d'un rayon lumineux de deux points spatialement proches. L'avantage de cette technique est qu'elle permet l'observation de cellules vivantes sans aucune coloration ni marquage, et donne accès à un paramètre supplémentaire par rapport à la microscopie classique.

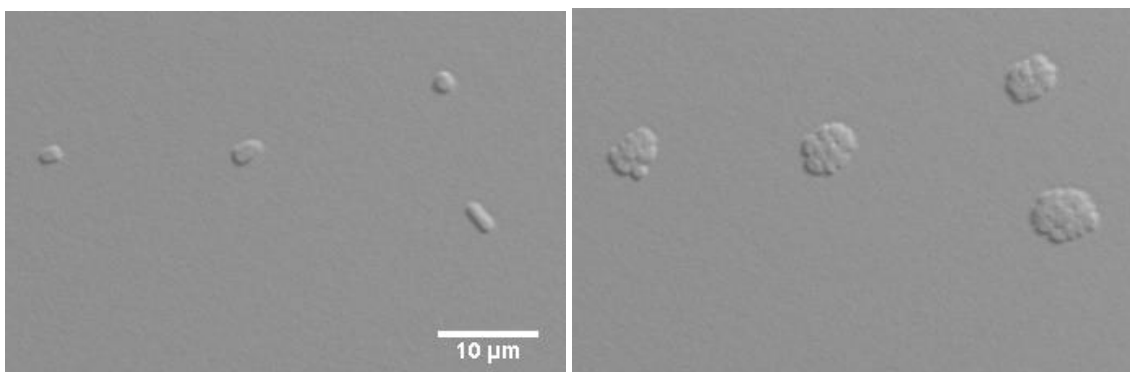


Figure 9 : *Haloferax volcanii* observée au DIC. (A) Des cellules isolées. (B) Les mêmes cellules, 16h plus tard, en micro-colonies.

La microscopie à fluorescence

Un microscope à fluorescence est un microscope tirant avantage de la fluorescence pour l'observation des échantillons ainsi que pour la génération d'images. La fluorescence va être obtenue grâce à un fluorophore, c'est-à-dire une molécule ayant la propriété d'être excitée par une source lumineuse. L'excitation se fait à une longueur d'onde donnée, dépendante du fluorophore, et correspond au déplacement des électrons du fluorophore vers des orbitales électroniques moins stables. Les électrons vont chercher à regagner leur état d'origine, et vont réémettre pour cela une onde lumineuse, de longueur d'onde plus grande que l'onde excitatrice, on parle d'émission spontanée.

La source lumineuse d'excitation du fluorophore peut être un laser, une LED, ou une source de lumière blanche dont une longueur d'onde spécifique a été sélectionnée. Un des inconvénients est que les fluorophores ne peuvent pas absorber et émettre de la lumière indéfiniment. En effet, lorsqu'ils sont excités, ils possèdent une faible chance de réagir avec des radicaux oxygénés présents dans le milieu, entraînant une dénaturation irréversible. On parle alors de photoblanchiment. De plus, l'utilisation de longueurs d'ondes décalées dans l'UV (aux alentours de 300-400nm) peut entraîner un phénomène de phototoxicité, en altérant l'ADN par des cassures, ou par la création de dimères de thymine, car elles portent plus d'énergie.

Une seconde contrainte à cette technique est qu'elle nécessite le couplage de l'objet d'étude, le plus souvent une protéine, à un fluorophore. Il existe deux façons courantes d'y parvenir : coupler un anticorps au fluorophore par traitement chimique, ou fusionner au niveau traductionnel la protéine d'intérêt à une protéine fluorescente. Concernant ce dernier point, les avancées technologiques depuis la découverte de la GFP sauvage chez *Aequorea victoria* par Osamu Shimomura, et sur optimisation par Roger Tsien (Tsien 1998), nous disposons aujourd'hui d'une large palette de couleurs de protéines fluorescentes optimisées pour beaucoup de modèles d'études (Müller-Taubenberger and Anderson 2007).

La fusion de protéines à une protéine fluorescente permet l'utilisation de cellules vivantes, et donc un suivi de l'évolution de l'échantillon directement sous le microscope : on parle alors de *Time lapse*, qui correspond à un suivi spatio-temporel du signal de fluorescence au sein des échantillons.

En plus du développement de protéines et de marqueurs fluorescents améliorés, les microscopes et les ordinateurs auxquels ils sont reliés sont également de plus en plus performants. L'ensemble a permis le

développement d'un nouveau type de microscopie, dite « de super résolution », qui permet d'obtenir une résolution inférieure à 200 nm, limite due à l'utilisation des photons.

Une première technique consiste en l'élimination sélective des signaux de fluorescence (STED pour *Stimulated Emission Depletion*) (Hell and Wichmann 1994), permettant de mieux résoudre spatialement la position des fluorophores. Cette technique nécessite un faisceau d'excitation classique, mais également un second faisceau de désexcitation en forme d'anneau, qui induit une désexcitation des fluorophores par émission stimulée. En superposant les deux faisceaux, on se retrouve avec une zone de l'échantillon stimulée par le laser d'excitation, et immédiatement autour de celle-ci, la zone en anneau du faisceau de désexcitation. Les fluorophores situés à la périphérie émettent un signal lumineux d'une longueur d'onde différente des fluorophores présents au centre de l'anneau, il est alors possible de sélectionner la longueur d'onde collectée.

Une seconde technique, basée sur l'utilisation de fluorophores particuliers, est la technique STORM (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) (Rust, Bates, and Zhuang 2006), ou également la technique PALM (*Photo-Activated Localisation Microscopy*), basées sur les mêmes principes. Les fluorophores d'un échantillon, qui sont trop proches pour être résolus spatialement par le microscope, sont activés de façon asynchrone afin de collecter le signal de manière séquentiel. Pour le STORM, un fluorophore particulier photoactivable est nécessaire. Ainsi, certains fluorophores de l'échantillon sont activés, de manière aléatoire, par des flashes lumineux. L'observation répétée des fluorophores permet d'obtenir une image mieux résolue, grâce à une localisation du signal basée sur l'ajustement d'une fonction gaussienne du profil d'émission. Cette technique permet d'obtenir une résolution jusqu'à 20 nm.

L'illumination structurée (SIM pour *Structured Illumination*) (Gustafsson 2000) permet une amélioration de la résolution latérale et éventuellement axiale jusqu'à un facteur 2, (2D-SIM ou 3D-SIM). Cette technique est basée sur les franges de moiré : en éclairant l'échantillon par une grille de lumière, il se forme un réseau dit « de moiré », et il est alors possible d'extraire une image super-résolue en analysant ce réseau. Cette analyse repose sur l'extraction d'information haute fréquence dans le spectre de l'image. Cependant, dans ce cas, la résolution ne peut être améliorée que suivant une direction perpendiculaire à la grille de lumière. En pratique, pour obtenir une image avec une résolution améliorée suivant toutes les directions, le procédé décrit ci-dessus est répété pour différentes orientations de la grille de lumière.

	STED	STORM/PALM	SIM
CONCEPT	Emission et désexcitation stimulée	Activation asynchrone des fluorophores	Illumination structurée
RESOLUTION (XY)	80 nm	>50 nm	100 nm
RESOLUTION (Z)	50 nm	30 nm	
VITESSE D'ACQUISITION	Moyenne	Très long	Long
AVANTAGES	Bonne vitesse d'acquisition	Meilleure résolution latérale	Pas besoin de fluorophores particulier
INCONVENIENTS	Photo-toxicité liée au laser de désexcitation	Photo-toxicité lié au long temps d'acquisition	Photoblanchiment important
		Nécessite des fluorophores particulier	Super résolution limitée

Tableau 3 : Résumé des caractéristiques principales des techniques de super résolution abordées. https://www.photonics.com/Articles/Challenges_and_Opportunities_in_Superresolution/a61868 (Russell Ulbrich)

Comme pour le DIC, la microscopie à fluorescence nécessite une architecture particulière de microscope et ne peut donc pas être utilisée sur un microscope qui n'a pas été prévu à cet effet (Fig. 10).

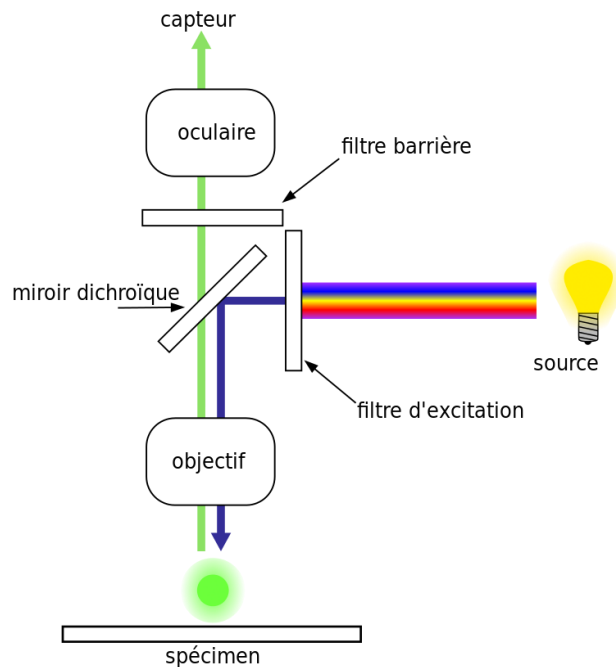


Figure 10 : Schéma d'un microscope à épifluorescence.

Selon Zeugma FluorescenceFilters.svg: Krzysztof Blachnicki - derivative work of FluorescenceFilters.svg, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=12051492>

2) PRINCIPE DU MARQUAGE DE L'ADN ET TECHNIQUES ASSOCIEES PERMETTANT SON OBSERVATION

Une autre façon d'obtenir des informations sur la réplication est de s'intéresser à l'ADN, et plus particulièrement à l'ADN néosynthétisé. La voie classique pour marquer l'ADN est de permettre l'incorporation par une cellule en division des analogues de la thymidine à son ADN pendant un temps court. Il existe plusieurs analogues de la thymidine, dont certains sont présentés ci-dessous (Fig. 11) :

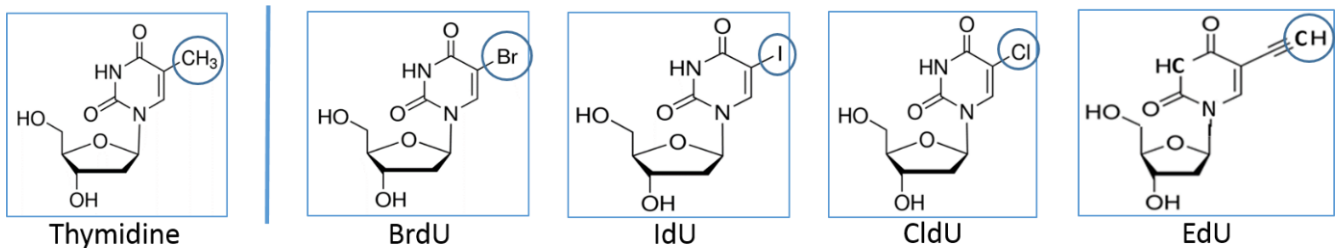


Figure 11 : Les analogues de la thymidine.

- Les analogues comprenant un halogène à la place du groupement méthyle de la thymidine (BrdU, CldU et IdU pour, respectivement : 5-Bromo/Cloro/Iodo-2'-déoxyridine (Fig. 11)). Ces analogues sont immunogènes et peuvent donc être reconnus par un anticorps. Cela permet une immunodétection de l'ADN néosynthétisé, mais l'épitope étant situé vers l'intérieur de la double hélice de l'ADN, l'immunodétection nécessite au préalable une dénaturation de l'ADN. Les anticorps anti-BrdU reconnaissent très bien tous les dérivés halogénés de la thymidine, il est alors possible de procéder à deux types de marquage : les marquages simples (le plus souvent avec la BrdU), et les doubles marquages en utilisant le couple CldU/IdU. L'astuce réside en l'utilisation de deux anticorps anti-BrdU, dont un clone particulier perd son affinité pour le CldU s'il est dans une solution fortement concentrée en sel.

- Il existe un autre analogue de la thymidine : l'EdU (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine). Cet analogue se base sur le principe de la chimie-click, qui correspond à la création d'une liaison covalente irréversible entre un azide (N_3) et un alcyne ($C\equiv C$), formant un groupement thiazole (Fig. 12A), pour la détection. Le principe de cette chimie permet de lier covalamment n'importe quelles molécules, biologiques ou synthétiques, en ajoutant ces groupements azide et alcyne. Dans le cas de l'EdU, il porte le groupement alcyne, et il est possible de lui greffer toute autre molécule portant le groupement azide, comme un fluorophore. Cela fait de l'EdU un

analogue très polyvalent, et, de par la petite taille de son groupement alcyne, l'ADN ne nécessite pas de dénaturation de l'ADN (Fig. 12B).

Ces analogues présentent par ailleurs un effet cytotoxique, plus ou moins marqué selon l'analogue. L'effet cytotoxique de l'EdU est important et peut rendre son utilisation délicate (Gristwood et al. 2012).

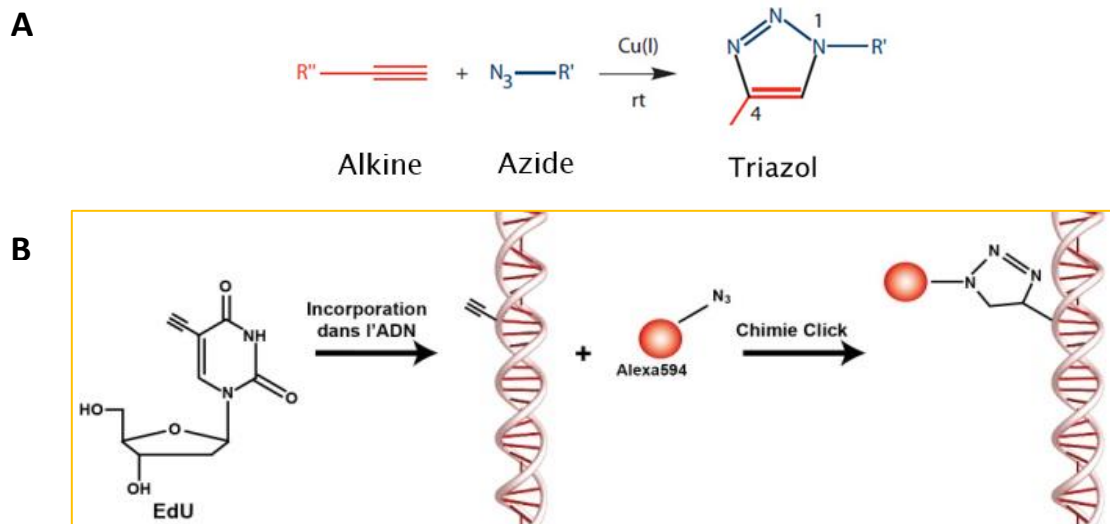


Figure 12 : La chimie-click (A) - Le principe de la chimie-click. (B) - Exemple d'application pour la microscopie à fluorescence.

D'une manière générale, le marquage de l'ADN chez les cellules eucaryotes se fait relativement aisément. Chez les bactéries, il est nécessaire de construire un mutant auxotrophe pour la thymidine, afin de forcer la cellule à utiliser la voie de récupération des pyrimidines et aller récupérer la thymidine, ou un analogue, dans le milieu de culture. Chez *E. coli*, Pham *et al* ont cherché à améliorer l'incorporation des analogues, et ont supprimé plusieurs gènes impliqués soit dans le catabolisme des bases non canoniques (*yjg*), soit dans le catabolisme de la thymidine (*deoA/B/C*). La souche résultante, eCOMB, présente une incorporation significativement améliorée (Pham et al. 2013).

Le marquage de l'ADN par les analogues de la thymidine permet également l'étude au niveau de la molécule unique. Il est possible d'extraire l'ADN d'une souche qui a poussé en présence d'un analogue, et en étirant les fibres d'ADN sur une lamelle de verre, il est possible d'observer ces fibres avec un microscope à fluorescence par immunodétection. On parle dans ce cas de peignage moléculaire. En observant la distribution de l'incorporation des analogues sur le chromosome, un certain nombre d'informations peuvent alors être obtenues (mesure de la vitesse de réplication, du nombre d'origines de réplication active sur un

chromosome, leur répartition, le pourcentage d'ADN répliqué...) (Pham et al. 2013). L'intérêt de cette technique est de pouvoir obtenir des informations qui nous sont inaccessibles à l'échelle d'une population cellulaire. Par exemple, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, où plusieurs centaines d'origines de réplication potentielles ont été trouvées, des gels 2D ont montré que seuls 20% de ces origines étaient actives. Le peignage moléculaire a pu apporter comme information supplémentaire que ces origines étaient activées par groupe de 2 à 5 origines adjacentes (Tuduri, Tourrière, and Pasero 2010). L'inconvénient de cette méthode est qu'elle ne permet pas d'avoir accès aux séquences observées, mais elle peut être couplée avec du FISH (*Fluorescence in situ hybridization*). De plus, elle nécessite une extraction de l'ADN particulièrement douce afin d'avoir le moins de cassures possibles de l'ADN, et elle nécessite de l'ADN linéaire. Dans les meilleures conditions (principalement vitesse de peignage lente et concentration ionique optimisée), il est possible d'obtenir des fragments jusqu'à 12 Méga-bases (Kaykov et al. 2016), le génome *H. volcanii* est donc théoriquement peignable en un seul morceau.

Une méthode alternative au peignage moléculaire est l'utilisation de nanopores pour étirer et séquencer la molécule d'ADN. Lors du séquençage, la double hélice d'ADN est séparée et seul un des deux brins passe par le nanopore protéique, ce qui produit un signal caractéristique électrique selon la séquence qui le traverse. Cette technique est également sensible à la présence d'analogues de la thymidine, et permet donc, en plus du séquençage de l'ADN, de déterminer où se situent ces analogues sur le chromosome. Sur des cellules synchronisées de *S. cerevisiae*, cette technique a permis de déterminer l'activation des origines de réplication grâce à une incorporation de BrdU, d'étudier la fréquence d'activations d'origines trop peu fréquemment actives pour être détectées en travaillant avec des populations cellulaires, et d'identifier les événements d'arrêts de fourches grâce à une asymétrie d'incorporation de la BrdU dans les réplicons (Müller et al. 2019).

3) LE MARQUAGE DES PROTEINES ET DE L'ADN COMME OUTIL POUR ETUDIER LA REPLICATION

De nombreuses études utilisant la microscopie ont déjà été menées dans les trois domaines du vivant pour étudier la réplication. Ainsi, beaucoup de mécanismes fondamentaux de la réplication ont été découverts chez les bactéries et les eucaryotes grâce aux fusions GFP et au marquage de l'ADN, et souvent grâce aux deux à la fois. Certains organismes modèles nous ont livré beaucoup de leurs secrets. C'est le cas

chez les bactéries comme *B. subtilis* (Berkmen and Grossman 2006), *C. crescentus* (Jensen, Wang, and Shapiro 2001), *E. coli* (Reyes-Lamothe et al. 2008), et chez les eucaryotes, des levures *S. cerevisiae* et *S. plombe*, aux cellules de mammifères.

Chez *B. subtilis*, la localisation du réplisome a été étudiée grâce à l'expression de PCNA fusionnée à la GFP. Il apparaît que le réplisome est relativement stationnaire et situé exclusivement au milieu de la cellule, bien que près de la moitié des cellules présentent deux foyers de localisation du réplisome spatialement proches, qui peuvent fusionner ou se séparer dans un intervalle de temps court (en quelques secondes). Cette localisation du réplisome correspond à la localisation de l'origine de réplication au moment de l'initiation. Les origines de réplication déjà répliquées sont délocalisées rapidement au centre des futures cellules filles, et ce avant que la réplication soit entièrement terminée (Berkmen and Grossman 2006).

Chez *C. crescentus*, le réplisome (complexe protéique de la machine moléculaire permettant la réplication de l'ADN) a également été étudié grâce à une GFP ou YFP fusionnée avec les sous-unités de la polymérase répliquative, ainsi que par une fusion DnaB-YFP (l'homologue de Orc). Il apparaît que les deux fourches de réplication restent proches l'une de l'autre tout au long de la réplication. L'origine de réplication est, contrairement à *B. subtilis*, localisée au niveau d'un pôle de la cellule lors de l'initiation, et la machinerie de réplication se déplace doucement vers le centre de la cellule au fur et à mesure de l'avancement de la réplication (Jensen, Wang, and Shapiro 2001).

Chez *E. coli*, la machinerie de réplication s'assemble également autour de l'origine de réplication, qui est située près du centre de la cellule. Les deux fourches de réplication se séparent rapidement et migrent chacune d'un côté de la cellule. Malgré sa localisation particulière, le réplisome est chez *E. coli* très dynamique, bougeant le long du grand axe de la cellule, et parfois allant jusqu'à se rapprocher suffisamment de l'autre fourche qu'ils ne soient plus dissociables avec la résolution du microscope. Il semblerait que chez cette bactérie, le réplisome se déplace le long de l'ADN selon le modèle d'un train sur des rails, plutôt que le modèle du réplisome qui fonctionnerait comme une pompe à ADN (Reyes-Lamothe et al. 2008; Reyes-Lamothe et al. 2012). Grâce à de la microscopie super résolue et une fusion des protéines de la réplication avec des protéines fluorescentes, il a été possible de déterminer le nombre de copies présentes de ces protéines dans la cellule, ainsi qu'à la fourche de réplication. Ainsi, il a été estimé que la cellule possède entre 10 et 20 molécules d'ADN polymérase par cellule et environ 140 molécules du complexe de chargement de l'anneau de processivité (l'homologue de RFC). La fourche de réplication contiendrait entre 5 et 11 SSB ainsi que 3 polymérases répliquatives (Reyes-lamothe, Sherratt, and Leake 2010).

Les eucaryotes présentent des protéines et des mécanismes liés à la réplication et la réparation ressemblant aux archées, cependant il existe certaines différences notables. Par exemple les séquences

permettant l'initiation de la réplication sont très divergentes, malgré des protéines d'initiation très conservées chez tous les eucaryotes. Chez les levures, les séquences d'initiation sont bien définies, alors que dans les cellules de mammifères, il ne semble pas y avoir de séquences consensus spécifiques (Cvetič and Walter 2005). Chez les cellules de mammifères, le marquage de l'ADN a permis d'observer qu'il y a entre 5 et 20 origines activées à la périphérie du nucléole (Kennedy et al. 2000). La protéine PCNA fusionnée à la GFP a permis, *via* des expériences de *Time lapse*, de déterminer que les foyers de réplication apparaissaient et disparaissaient au cours du cycle cellulaire pour former des motifs spécifiques de chaque phase du cycle. Les foyers de réplication ne se déplaçant pas, cela suggère un ancrage au squelette nucléaire, et un déplacement de l'ADN pompé à travers la machinerie de réplication (Leonhardt et al. 2000).

Chez les archées, des études similaires n'ont été réalisées que chez *Sulfolobus acidocaldarius* et *Sulfolobus solfataricus*.

Chez l'archée *S. acidocaldarius*, l'immunomarquage de PCNA et le marquage de l'ADN a révélé qu'il n'y a pas de confinement des fourches de réplication : les fourches issues d'origines différentes sont indépendantes les unes des autres. Mais il semblerait qu'il y ait une association des fourches issues d'une même origine, et que celles-ci seraient associées à la périphérie cellulaire (Gristwood et al. 2012).

Chez les archées, les exemples de marquage de l'ADN par les analogues de la thymidine sont plus rares. Gristwood *et al* se sont intéressés à la distribution de l'ADN néosynthétisé et aux fourches de réplication en cellule entière chez l'archée *Sulfolobus solfataricus* (Gristwood et al. 2012). Ils ont pour cela construit une souche capable d'incorporer les analogues de la thymidine. Chez *Sulfolobus* il n'existe pas de voie de récupération des pyrimidines, elle a donc été ajoutée en surexprimant la thymidine kinase (une enzyme clef impliquée dans la voie de récupération des pyrimidines) de *P. aerophilum*, une autre archée hyperthermophile, à partir d'un plasmide. Cela leur a permis de localiser dans la cellule l'ADN néosynthétisé en incorporant des analogues de la thymidine (BrdU et EdU) pendant un temps de culture court (20 min d'incorporation, le temps de génération étant de 4h). Ils ont ainsi pu observer une localisation périphérique de la machinerie de réplication, l'association des fourches issues d'une même origine, et parfois jusqu'à trois foyers de réplication par cellule, ce qui est interprété par les auteurs comme étant les trois origines de réplication de *S. solfataricus*. Chez *S. solfataricus*, un marquage de l'ADN plus long que 20 min entraîne un marquage global de la cellule.

IV] LES OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à la dynamique de la réplication chez l'archée *Haloferax volcanii* afin de mieux comprendre comment était initiée la réplication chez cette archée. *H. volcanii* est une archée possédant un grand nombre de copies de son chromosome principal et plusieurs origines de réplication. On sait également qu'elle possède un grand nombre de protéines Orc1/cdc6, qui régulent de manière complexe l'initiation de la réplication. Comprendre combien d'origines sont activées à chaque division cellulaire, et combien de copies du chromosome sont répliquées permettrait de mieux appréhender ces mécanismes de régulation. De plus, il est possible d'étudier cette initiation dans différentes conditions de stress (agent génotoxiques, irradiation aux UVs, agents bloquant la réplication, seuvrage...) pour obtenir plus d'informations sur la régulation de l'initiation de la réplication.

L'étude de la souche sans origine de réplication, dans ces différentes conditions, permet également d'apporter des informations sur les mécanismes d'initiation.

Les questions que je me suis posé pendant ma thèse sont : Est-ce que toutes les origines de réplication sont actives dans une cellule ? Est-ce que toutes les origines de réplication sont actives sur un chromosome ? Est-ce que tous les chromosomes sont répliqués lors d'une division cellulaire ? Quelles différences peut-on observer chez la souche sans origine de réplication permettant de comprendre comment la réplication est initiée ? Est-ce qu'une culture subissant un stress modifie son initiation ?

Pour répondre à ces questions, deux approches ont été abordées :

- D'une part, grâce aux fusions de la GFP avec les protéines de la réplication, principalement RPA2, afin de les localiser dans les cellules à différentes étapes du cycle cellulaire (thèse de Floriane Delpech mais qui fait partie intégrante de mon projet). Afin d'apporter des informations dynamiques sur ces processus, j'ai commencé le développement d'une technique de Time Lapse en fluorescence.

- D'autre part, afin d'apporter des informations supplémentaires et de pouvoir étudier la réplication sous un autre angle, j'ai mis au point le marquage de l'ADN néosynthétisé chez *H. volcanii*. Cela m'a permis de pouvoir localiser l'ADN par immunodétection, ceci dans la cellule à différentes étapes du cycle cellulaire, mais également afin de pouvoir étudier la réplication à l'échelle de la molécule unique.

Matériel et méthode

I] SOUCHES ET CULTURE CELLULAIRE

1) *HALOFERAX VOLCANII*

Souche	Génotype	Utilisation	Reference
H26	$\Delta pyrE2$	Souche de laboratoire	(Allers et al. 2004)
H1804	$\Delta pyrE2, \Delta trpA, \Delta oriC1, \Delta oriC2, \Delta oriC3, \Delta ori-pHV4$	Souche de laboratoire sans origine de réplication	(Hawkins et al. 2013)
HvYC0	$\Delta pyrE2, \Delta hts/hdrB$	Marquage de l'ADN néosynthétisé par incorporation d'analogues de la thymidine	(Delpech et al. 2018)
HvYC1	$\Delta pyrE2, \Delta hts/hdrB, gfp::rpa2$	Marquage de l'ADN néosynthétisé et localisation de la protéine RPA2	Cette étude
HvYC2	$\Delta pyrE2, \Delta hts/hdrB, gfp::hef$	Marquage de l'ADN néosynthétisé et localisation de la protéine HEF	Cette étude
HvYC4	$\Delta pyrE2, \Delta trpA, \Delta oriC1, \Delta oriC2, \Delta oriC3, \Delta ori-pHV4, \Delta hts/hdrB$	Marquage de l'ADN néosynthétisé en absence des origines de réplication	Cette étude
HvYC5	$\Delta pyrE2, \Delta hts/hdrB, \Delta HVO_0968$	Délétion de la séquence putative de DeoA dans le but d'améliorer le marquage de l'ADN néosynthétisé	Cette étude
HvYC6	$\Delta pyrE2, \Delta hts/hdrB, \Delta HVO_1415$	Délétion de la séquence putative de Yjgg dans le but d'améliorer le marquage de l'ADN néosynthétisé	Cette étude
HvYC7	$\Delta pyrE2, \Delta hts/hdrB, p-(Hsa)tdk+$	Surexpression de la thymidine kinase de <i>H. salinarum</i>	Cette étude

Tableau 4 : Les souches d'*H. volcanii* utilisées pour cette étude.

La culture de *Haloferax volcanii* s'est effectuée dans du milieu riche YPC : 2,5M NaCl, 90mM MgCl₂, 84mM MgSO₄, 54mM KCl, 3mM CaCl₂, 1,8mM KOH, 12mM Tris-HCl, 5mg/mL Extrait de levure, 1mg/mL Peptone, 1mg/mL Casamino acids. Le milieu de culture est incubé à 45°C sous agitation (150 rpm).

Lorsque cela est précisé, la culture est effectuée dans un milieu « casa », qui est un milieu moins riche ne contenant ni extrait de levure ni peptone : 2,5M NaCl, 90mM MgCl₂, 84mM MgSO₄, 54mM KCl, 3mM CaCl₂, 2,4M KOH, 1mg/mL Casamino acids. Le milieu de culture est incubé à 45°C sous agitation (150 rpm).

Lors du lavage des cellules, de l'eau salé 18% (SW 18%) est utilisé pour resuspendre les cellules : 2,5M NaCl, 90mM MgCl₂, 84mM MgSO₄, 54mM KCl, 3mM CaCl₂, 1,8mM KOH, 12mM Tris-HCl.

De la thymidine à 165 μM est ajoutée au milieu de culture pour les souches portant la délétion $\Delta\text{hts}/\text{hdrB}$, et du tryptophane à 200 μM est ajouté dans le cas de culture des souches portant la délétion ΔtrpA .

Pour le marquage de l'ADN, une préculture est effectuée en YPC contenant de la thymidine, puis les cellules sont diluées et mises en culture dans du YPC auquel on ajoute l'analogue de la thymidine souhaité (BrdU, Cldu, IdU, EdU) à 100 μM .

Les cultures sur milieu solide se sont effectuées en milieu YPC ou casa contenant 15 mg/mL d'agar.

Pour une conservation à long terme des souches, les souches sont stockées à -80°C dans du milieu de culture contenant 20% de glycérol.

2) *ESCHERICHIA COLI*

Souche	Génotype	Utilisation	Reference
XL-1 blue	$\Delta\text{mcrA183}$, $\Delta\text{mcrCB-hsdSMR-mrr173}$, endA1 , supE44 thi-1 , recA1 , gyrA96 , relA1 , lac [F-proAB lacIqZ Δ M15 Tn10]	Construction des plasmides de clonage	Chem-aligent #200249
GM121 (dam-)	F-, dam-3 , dcm-6 , ara-14 , fhuA31 , galk2 , galT22 , hdsR3 , lacY1 , leu-6 , thi-1 , thr-1 , tsx-78	Obtention d'ADN non méthylé pour la transformation d' <i>H. volcanii</i>	(Allers et al. 2004)

Tableau 5 : Les souches d'*E. coli* utilisées pour cette étude.

La culture liquide d'*Escherichia coli* s'est effectuée dans du milieu LB (H_2O , 5mg/mL d'extrait de levure, 10 mg/mL tryptone, 10mg/mL NaCl), incubée à 37°C sous agitation (150 rpm).

Les cultures sur milieu solide se sont effectuées en milieu LB, additionné de 15 mg/mL d'agar.

Dans le cadre des clonages, de l'ampicilline est ajoutée à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour permettre une sélection des transformants.

Pour une conservation à long terme des souches, les souches sont stockées à -80°C dans du milieu de culture contenant 20% de glycérol.

3) *HALOBACTERIUM SALINARUM*

Souche	Génotype	Utilisation	Reference
<i>Halobacterium salinarum</i>	NRC-1	Amplification du gène de la thymidine kinase	(Pfeiffer et al. 2008)

Tableau 6 : La souche d'*H. salinarum* utilisée pour cette étude.

La culture liquide de *Halobacterium salinarum* s'est effectuée en milieu complet (H₂O, 4,2M NaCl, 80mM MgSO₄, 25mM KCl, 10mM Sodium citrate, 3g/L Extrait de levure, 5g/L Tryptone), incubée à 45°C sous agitation (150 rpm).

Je remercie l'équipe « Extrémophiles et grands assemblages moléculaires » de Bruno Franzetti à Grenoble de m'avoir envoyé cette souche.

II] DELETION DE GENES CHEZ *H. VOLCANII*

Pour la suite des manipulations, toutes les enzymes de biologie moléculaire proviennent de chez thermo-scientifique (Massachusetts, Etats-unis), sauf contre-indication.

1) PRINCIPE

L'inactivation de gène se fait par l'utilisation d'un plasmide non répliatif chez *H. volcanii* (pTA131 (Allers et al. 2004)) dans lequel a été cloné deux régions chromosomiques de 300-400 pb, respectivement situées en amont (US) et en aval (DS) du gène à délérer. Le plasmide est un vecteur navette dérivé du pBluescriptII, contenant une origine de répliation chez *E. coli*, un marqueur de sélection chez *E. coli*, un marqueur de sélection chez *H. volcanii* et le gène *lacZ*, contenant le site multiple de clonage. L'insert est intégré au plasmide par la méthode *sequence and ligation independent cloning* (SLIC) (Li and Elledge 2007). Chaque insert, généré par PCR, présente une région d'homologie de 30 nucléotides avec le fragment adjacent. Le vecteur et les inserts sont traités séparément à la T4 DNA polymérase, dont l'activité exonucléasique va générer des extrémités simple brin, car le milieu de réaction ne contient pas de dNTP. Puis un mélange contenant chacun des fragments est réalisé pour permettre l'hybridation des extrémités simple brin par homologie, formant un plasmide circulaire utilisé pour transformer *E. coli* (Fig. 13).

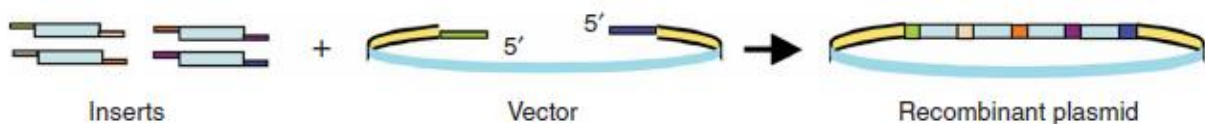


Figure 13 : Schéma de la réaction de SLIC (Li and Elledge 2007).

Dans le but de réaliser une délétion de gène, deux inserts sont clonés : une région upstream (US), en amont du gène à déléter, et une région downstream (DS), en aval. Les inserts constituent ainsi deux régions d'homologie entre le plasmide et le chromosome. Par un premier évènement de recombinaison homologue dans l'une des régions d'homologie (US ou DS), le plasmide va s'intégrer dans le génome. La souche résultante possède alors chacune de ces régions d'homologie en deux exemplaires (Fig. 14a). Un deuxième évènement de recombinaison est ensuite sélectionné, qui correspond à l'excision du plasmide. En fonction de la région d'homologie dans laquelle va se faire le deuxième évènement de recombinaison, on va pouvoir obtenir deux types de souches : la souche native si l'évènement a lieu dans la même région d'homologie que le premier (US puis US, ou DS puis DS), et la souche mutante si chacun des évènements de recombinaison s'est effectué dans une région d'homologie différente (US puis DS, ou DS puis US) (Fig. 14b).

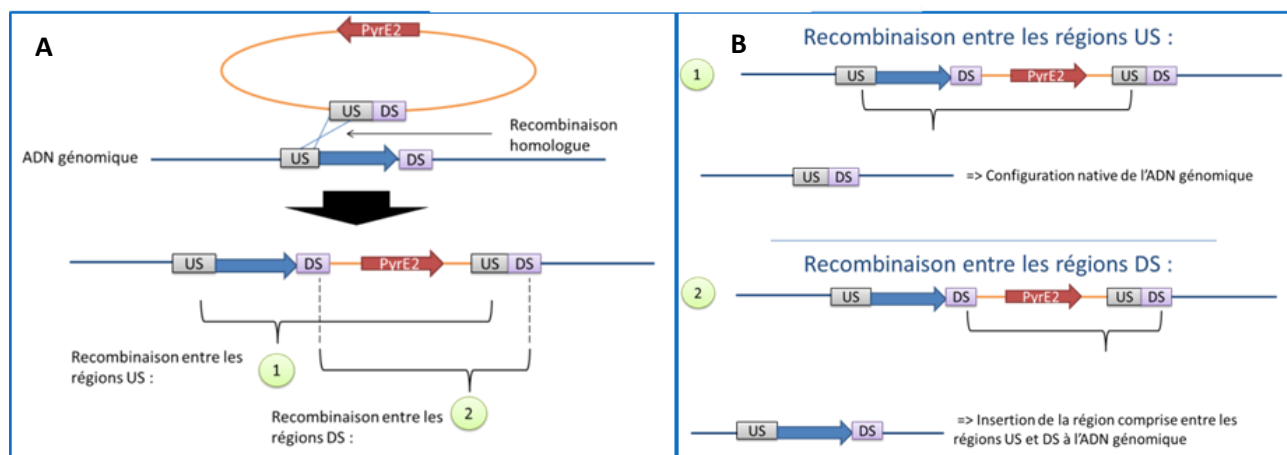


Figure 14 : Schématisation du Pop-in/Pop-out. (A) - Insertion du plasmide. (B) - Excision du plasmide.

La sélection repose sur un marqueur, le gène *pyrE2*, à la fois sélectionnable et contre-sélectionnable. Il est porté par le plasmide et absent du chromosome dans la souche à transformer (Allers et al. 2004). Basé sur le métabolisme de l'uracile, la sélection des souches s'effectue sur leur capacité à synthétiser ou non l'UMP par la voie *de novo*. La souche à transformer est initialement $\Delta pyrE2$, donc auxotrophe pour l'uracile. L'intégration du plasmide supprime l'auxotrophie puisque le gène *pyrE2* est intégré dans le génome : cela

nous permet de sélectionner les organismes transformés alors capables de pousser sur un milieu dépourvu d'uracile. Les souches transformées vont ensuite être mises en culture sur un milieu contenant de l'uracile et du 5-FOA. Le 5-FOA (acide 5-fluoro-orotique) est un précurseur impliqué dans la voie de biosynthèse des pyrimidines, qui ne présente pas de toxicité en lui-même pour la cellule. Il va être métabolisé au même titre que l'uracile pour donner du 5-FdUMP, qui est un inhibiteur de la thymidylate synthase dont l'activité est essentielle à la survie de la cellule : la thymidylate synthase est responsable de la synthèse du stock de dTMP essentiel à la synthèse d'ADN. Ainsi l'inactivation de la thymidylate synthase résultant du métabolisme du 5-FOA entraîne la mort de la cellule. Seules les cellules dont le plasmide est excisé, et qui sont de nouveau $\Delta pyrE2$, peuvent croître en présence de 5-FOA dans le milieu car il n'est plus métabolisé par la cellule. Ces souches ayant excisé le plasmide peuvent correspondre soit à la souche native (50% des cas) soit à la souche mutante. Il nous faut donc mettre en place un crible afin de les différencier.

Les différents clones obtenus sont repiqués sur un milieu riche, puis la présence du gène à déléter révélée par hybridation sur colonies en utilisant une sonde ADN spécifique de notre insert, marquée au digoxygénine (DIG) et révélée par chimioluminescence .

2) CONSTRUCTION DE PLASMIDES INTEGRATIFS

Amplification des régions US et DS par PCR

Les régions US et DS des différents gènes délétés ont été obtenues par PCR (*polymerase chain reaction*) en utilisant les amorces présentées dans le tableau 7.

La polymérase utilisée est la Q5 (ref M0491S) de NEB (Massachusetts, Etats-unis), une polymérase de haute fidélité supportant un taux de GC élevé. Le mélange réactionnel a été réalisé selon les recommandations du fournisseur en utilisant le tampon « high GC enhancer ». Chaque produit de PCR obtenu est purifié par électrophorèse sur gel d'agarose grâce au kit GeneJet Gel extraction Kit (#K0691).

Nom de l'amorce	Séquence 5' ->3'	Taille de l'amorce	Tm	Description
RL208	CGACGGTATCGATAAAGCTTGATATCGAATTGGCGAGTCGCGACGCTCGGGC	51	62	Fragment US HTS
RL209	TTTGTACTCCCACTCGCCCGAGTTACTCATGAGAGGTGCCCTGGTTGGGTG	51	62	Fragment US HTS
RL210	GACGACCAACACCCAACCAGGGCACCTCTCATGAGTAACTCGGGCGAGTGG	51	58	Fragment DS HDRB
RL211	AAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCACGCGAGTCTGCGTCGGCTCC	51	58	Fragment DS HDRB
YC1	CGACGGTATCGATAAAGCTTGATATCGAATTCCAAGCTCCGCGGTGACGGCGGG	53	69	Fragment US deoA
YC2	CCGCGCGGAGGGATTACCCGACGCTCGGGCGAGAGAG	37	69	Fragment US deoA
YC3	GCCCCACCGTCGGTAATCCCTCGCCGCGGCGACCTTTTC	41	63	Fragment DS deoA
YC4	AAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGCCCTCATGATGGTGCCTCGCGGAGG	56	63	Fragment DS deoA
YC5	CGACGGTATCGATAAAGCTTGATATCGAATTCCAAGCTCCGCGGTGACGGCGGG	52	65	Fragment US HVO_1415
YC6	GCCGCGGGAGCCGAGACGCTCTTTGGAGCGGCGGCG	37	65	Fragment US HVO_1415
YC7	GCTCCAAGAGAGCGTCTCGGCTCCCGCGGCTCGCCGT	38	68	Fragment DS HVO_1415
YC8	AAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGCCCTCATGATGGTGCCTCGCGGAGG	55	68	Fragment DS HVO_1415
YC9	CGACGGTATCGATAAAGCTTGATATCGAATTCACGTCGTCGGGTTGATGGTCC	52	55	Fragment US HVO_2370
YC10	TCTCGCGGACCGGTCGTCGGTGAAGCGTTGGCAA	35	55	Fragment US HVO_2370
YC11	AACGCTTACCGACGACCGGTCGCGGAGAGCGTCT	36	62	Fragment DS HVO_2370
YC12	AAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCACCGCATGGTCGTCGATTC	50	62	Fragment DS HVO_2370
RL280	CCCCTAAGTAGATTAGCCGTCGGCGTCC	29	60	PCR de PyrE2 sur pTA962
RL281	TGCAGCCATGGCGAAGCGAGC	21	60	PCR de PyrE2 sur pTA962
RL282	GCCCATATGCACGCCATCACGAACTCC	27	60	PCR de Tdk chez <i>H.sa</i>
RL283	GCCGAATTCTTACTCACGGCGCACGACATGG	31	60	PCR de Tdk chez <i>H.sa</i>
RL52	ATGAGCGGCGAGGAGCTTTCTGG	23	55	Sonde hts/hdrB
RL53	TTACTCATCGGATTCTCCG	20	60	Sonde hts/hdrB
RL233	GGCACCCGGTCGCCGACGGTCC	22	58	Sonde deoA
RL234	GAATCGGCGTGACGCGGTTGCC	22	58	Sonde deoA
RL235	AGCGGCGAGACCATCTACGCCG	22	58	Sonde HVO_1415
RL236	GAGACCGGCGGTTGGGCTCCG	22	58	Sonde HVO_1415
RL237	CGACCTCGACTACACTCGC	21	58	Sonde HVO_2370
RL238	AGCACCTGCACCGAAGCAGC	21	58	Sonde HVO_2370

Tableau 7 : Liste des amorces utilisées pour le clonage.

Sequence and ligation independant cloning (SLIC)

1 µg du vecteur pTA131 est linéarisé par digestion avec 1 U des enzymes de restrictions EcoRI et NotI à 37°C pendant 1 heure et purifié par électrophorèse sur gel d'agarose.

Un traitement à la T4 DNA polymérase du vecteur digéré et des produits de PCR est réalisé selon les conditions suivantes : 1 µg d'ADN pour 1 U T4 DNA polymérase dans son tampon 1X (volume final de 20 µL). Le traitement s'effectue à 22°C pendant 45 min, et la réaction est arrêtée avec 2 µL de dCTP 1 mM.

L'hybridation du plasmide et des régions US et DS est réalisée en les incubant 30 min à 37°C. 150 ng de plasmide traité à la T4 sont utilisés, et les inserts sont ajoutés pour respecter un ratio molaire plasmide : US : DS de 1 : 2 : 2.

3) TRANSFORMATION D'*ESCHERICHIA COLI*

Les transformations ont été effectuées par choc thermique. Les cellules ont été rendues compétentes en les cultivant jusqu'à DO = 0,5, de manière à obtenir des cellules en phase exponentielle de croissance, puis en bloquant leur métabolisme en les incubant 20 min dans la glace. Les cellules ont ensuite été centrifugées et suspendues dans 5 mL de solution TSS froide (85% LB, 10% PEG, 5% DMSO, 50 mM MgCl₂). Les cellules ainsi préparées peuvent être conservées quelques mois à -80°C.

Pour la transformation, 150 µL de cellules chimio-compétentes d'*E. coli* XL1-Blue ont été incubées avec environ 10 µL du mélange de ligation pendant 30 min sur la glace. Un choc thermique est ensuite réalisé à 42°C pendant 45 secondes, puis les cellules sont à nouveau incubées 2 min à 4°C. 850 µL de milieu LB est ajouté aux cellules, qui sont ensuite mises en culture à 37°C sous agitation (150 rpm) pendant 1h. Les cellules sont étalées sur un milieu LB solide contenant de l'Ampicilline (100 µg/mL), de l'IPTG (1 µM) et du X-gal (80 µg/mL), nous permettant un crible blanc-bleu des transformants. Les cellules blanches correspondent à des cellules transformées et possédant les régions US et DS insérées dans le site multiple de clonage du plasmide pTA131.

Une fois la présence de l'insert dans le plasmide vérifiée par restriction et séquençage, il est introduit dans la souche GM121 (*dam*-) pour permettre son amplification et sa purification grâce au kit Nucléobond

Xtra Midi Plus (MN ref 740412.20), permettant ainsi d'obtenir du plasmide non méthylé nécessaire à la transformation d' *H. volcanii*.

Plasmide	Spécificité	Utilisation	Référence
pTA131	Vecteur intégratif dérivé du pBluescript II. Possède un marqueur de sélection chez <i>E. coli</i> (<i>bla</i>), un marqueur de sélection chez <i>H. volcanii</i> (<i>pyrE2</i>) et une origine de réplication bactérienne.	Vecteur intégratif chez <i>H. volcanii</i>	(Allers et al. 2004)
pRL55	pTA131 dans lequel sont insérées les régions US de <i>hts</i> et DS de <i>hdrB</i>	Délétion des gènes <i>hts</i> et <i>hdrB</i>	(Delpech et al. 2018)
pYC1	pTA131 dans lequel sont insérées les régions US et DS de <i>deoA</i>	Délétion du gène <i>deoA</i> d' <i>H. volcanii</i>	Cette étude
pYC2	pTA131 dans lequel sont insérées les régions US et DS de <i>HVO_1415</i>	Délétion du gène <i>HVO_1415</i>	Cette étude
pYC3	pTA131 dans lequel sont insérées les régions US et DS de <i>HVO_2370</i>	Délétion du gène <i>HVO_2370</i>	Cette étude
pTA962	Vecteur non intégratif possédant un marqueur de sélection chez <i>E. coli</i> , une origine de réplication bactérienne, une origine de réplication chez <i>H. volcanii</i> , et deux marqueurs de sélection chez <i>H. volcanii</i> (<i>pyrE2</i> et <i>hts</i>)	Vecteur permettant une surexpression chez <i>H. volcanii</i>	(Allers et al. 2010)
pYC4	pTA962 dans lequel est retiré le gène <i>hts</i>	Vecteur permettant une surexpression	Cette étude
pYC5	pYC4 dans lequel est inséré le gène de la thymidine kinase d' <i>H. salinarum</i>	Surexpression de la thymidine kinase d' <i>H. salinarum</i>	Cette étude

Tableau 8 : Liste des plasmides utilisés.

4) TRANSFORMATION D'HALOFERAX VOLCANII

Pop-in

A partir d'une pré-culture en milieu liquide, la pré-culture est centrifugée pendant 10 min à 4000 rpm. Le culot est lavé en le resuspendant dans 2 mL de solution de sphéropastes tamponnée (le terme sphéropaste est utilisé chez *H. volcanii* pour désigner les cellules sans paroi, bien qu'elles ne possèdent pas

de peptidoglycane) (1M NaCl ; 27 mM KCl ; 50 mM de 1M Tris HCl pH 8,5 ; 15% Sucrose) et transféré dans un tube eppendorf 2 ml à fond rond et centrifugé 8 min à 6000 rpm. Le culot est resuspendu dans 600 μ L de solution de sphéroplaste tamponnée. 200 μ L de la suspension sont transférés dans un nouveau tube à fond rond, auxquels sont ajoutés 20 μ L d'EDTA 0,5M pH 8. L'ensemble est incubé 10 minutes à température ambiante. 30 μ L de mix d'ADN est ajouté aux sphéroplastés (1 à 2 μ g d'ADN dam^- purifié grâce au kit Nucléobond Xtra Midi Plus (MN ref 740412.20) dans 10 μ L) ; 15 μ L de solution de sphéroplastés non tamponnée (1M NaCl ; 27 mM KCl ; 15% Sucrose ; ajusté à pH 7,5 au NaOH) et incubé 5 minutes à température ambiante. 250 μ L de solution de PEG 600 60% (480 μ L de PEG 600 (réf sigma 87333) ; 320 μ L de solution de sphéroplastés non tamponnée) sont ajoutés, et le tube est remué très doucement sans l'inverser et laissé incubé 30 minutes sur la paillasse. 1,5 ml de solution de dilution des sphéroplastés (18% SW 30% ; 15% Sucrose 15% ; 3 mM CaCl_2) est ajouté avant centrifugation 8 min à 6000 rpm. Le culot est récupéré avec 1 ml de solution de régénération (YPC ; 15% de sucrose ; 1% de Thymidine 4 mg/ml), sans le resuspendre, et incubé 1h30 sans agitation à 45°C avant d'être mis à agiter pendant 3h environ. La culture est centrifugée 8 min à 6000 rpm, resuspendue dans 1 ml de 18% SW puis étalée sur milieu casa solide et incubée à 45°C pendant une semaine.

Pop-out

Un transformant est strié sur milieu casa, puis mis en culture en YPC à partir d'une colonie isolée. Une dilution au 1/500^{ème} est effectuée toutes les 24h pendant 3 jours, puis 100 μ L de la culture sont étalés sur un milieu casa + uracile (50 μ g/mL) + 5FOA (50 μ g/mL), afin de sélectionner les cellules ayant effectué le second évènement de recombinaison (ΔpyrE2).

Hybridation sur colonies

50 clones sont repiqués sur milieu YPC solide, puis transférés sur une membrane de nylon. La membrane est récupérée et placée face « colonies » vers le haut sur un papier absorbant imbibé de 10% SDS et laissée incubé 2 minutes. La membrane est ensuite placée sur un papier contenant la solution de dénaturation (1,5M NaCl ; 0,5 M NaOH) et est laissée incubé 5 minutes, puis deux fois sur un papier contenant la solution de neutralisation (1,5M NaCl ; 0,5 M Tris HCl pH 7,5 ; 1 mM EDTA) et incubée 3 minutes. La membrane est lavée en la trempant dans une solution de SSPE 2X (3M NaCl ; 200 mM Na_3PO_4 ; 20 mM

EDTA ; pH 7,4), puis déposée sur un papier absorbant sec pour la laisser sécher à l'air libre. La membrane est ensuite cross-linkée aux UVs (0,120 J/cm²). Les membranes sont incubées au moins 2h à 65°C sous agitation avec 25 mL de tampon de pré-hybridation (5X SSC; 1% BSA ; 0,1% N-lauroylsarcosine ; 0,02% SDS).

Une sonde marquée au DIG est construite par PCR grâce au kit DIG Luminescent Detection Kit (Roche ref 11 363 514 910). La PCR s'effectue avec la polymérase Q5 décrite précédemment, avec le mélange réactionnel suivant : 18,5 µL d'eau, 10 µL de tampon 5X, 10 µL GC Enhancer 5X, 5 µL PCR DIG Labeling Mix, 2.5 µL d'amorces à 10 µM, 1µL d'ADN matrice, 0.5 µL de polymérase Q5. Le produit de PCR est ensuite déposé sur gel grâce au kit GeneJet Gel Extraction Kit (#K0691) et la concentration en sonde est estimée par une mesure d'absorbance à 260 nm grâce à un nanodrop de chez Thermofisher (Massachusetts, Etats-Unis). La liste des amorces utilisées est disponible dans le tableau 6. 100 ng de sonde marquée au DIG est diluée dans un volume final de 10 µL (H₂O) et dénaturée 5-10 minutes à 95°C, puis placée dans la glace. Le tampon de pré-hybridation est éliminé, puis 25 mL de tampon frais de pré-hybridation est ajouté et chauffé à 65°C. La sonde est incubée avec la membrane sur la nuit à 65°C sous agitation. La membrane est lavée à 65°C avec la solution de lavage 1 (2X SSC ; 0,5% SDS) pendant 10 min puis pendant 30 minutes, puis avec la solution de lavage 2 (1X SSC ; 0,1% SDS) préchauffée à 65°C deux fois 20 minutes et enfin avec la solution de lavage 3 (0,1X SSC ; 0,1% SDS) préchauffée à 65°C pendant 20 minutes.

La révélation s'effectue par le « DIG Luminescent Detection kit (Roche, cat N°11 363 514 910) » : la membrane est lavée 5 minutes sous agitation avec 15 mL de solution de lavage (0,1 M acide maléique ; 0,15 M NaCl ; 0,3% Tween 20 ; pH 7,5), puis incubée sous agitation 2 fois 15 minutes avec 15 mL de solution de blocage 1X (dissoudre 1g de Blocking reagent (bottle 4) dans 100 mL de tampon d'acide Maleic (0,1 M acide maléique ; 0,15 M NaCl pH 7,5)). La membrane est incubée 30 min avec 15 mL de la solution contenant l'anticorps (centrifuger le tube 3 Anti-Dioxigenin-AP 1 min à 10 000 rpm, puis le diluer au 1:10 000ème dans la solution de blocage 1X). La membrane est lavée deux fois sous agitation pendant 15 minutes avec 15 mL de tampon de lavage, puis équilibrée avec 15 mL de tampon de détection (0,1 M Tris HCl ; 0,1 M NaCl ; pH 9,5) pendant 5 minutes sous agitation. La membrane est placée dans un sac à hybridation contenant 2 mL de solution CSPD (diluer au 1:100ème la solution de CSPD dans du tampon de détection). Le sac est immédiatement fermé en évitant de former des bulles d'air, et laissé incubé à température ambiante pendant 5 minutes. L'excès de solution est éliminé et la membrane est incubée humide 5 à 15 min à 37°C avant révélation au chémidoc de chez Biorad, 60 secondes d'exposition.

III] SUREXPRESSON DE LA THYMIDINE KINASE

La thymidine kinase est une enzyme clef de la voie de récupération. Dans le but d'optimiser l'incorporation des analogues de la thymidine, j'ai souhaité sur-exprimer la thymidine kinase. Pour éviter des phénomènes de recombinaison homologue, et pour éviter de modifier l'ADN chromosomique, j'ai choisi de sur-exprimer la thymidine kinase de *H. salinarum* à partir d'un plasmide. Le plasmide pTA962 est un plasmide réplcatif (Fig. 28, voir Résultats) (Allers et al. 2010) possédant deux marqueurs de sélection par compensation d'auxotrophie : une avec le gène *pyrE2* et une avec le gène *hdrB*. Dans notre cas, le gène *hdrB* ne doit pas être présent sur le plasmide pour ne pas restaurer la voie de biosynthèse de la thymidine. Le plasmide pTA962 est un vecteur navette contenant une origine de réplcation *colE1*, une origine de réplcation pHV2, un promoteur *p.tnaA* et un terminateur *t.Syn*, ainsi que deux marqueurs de sélection *pyrE2* et *hdrB*. Nous avons d'abord construit un dérivé du plasmide pTA962 ne contenant plus que le marqueur de sélection *pyrE2* (pYC5) dans lequel nous avons ensuite inséré le gène de la *tdk* d'*H. salinarum* (pYC6).

Construction du plasmide pYC5

A partir du plasmide réplcatif pTA962, une PCR a été effectuée dans le but d'obtenir la séquence du gène *pyrE2*. Le site de restriction *AflI* a été ajouté coté N-ter grâce à la queue flottante de l'amorce RL280 pour permettre une ligation avec le plasmide. Le produit de PCR a été purifié grâce au kit GeneJet Gel extraction Kit (#K0691).

Le plasmide pTA962 et le produit de PCR ont été digérés par les enzymes de restriction *AflI* et *NcoI*, dans les conditions recommandées par le constructeur. Ils ont ensuite été purifiés grâce au kit GeneJet Gel extraction Kit (#K0691). Le plasmide et l'insert ont été mélangés selon un ratio 1 : 3 et liés grâce à la T4 DNA Ligase, utilisée selon les recommandations du constructeur. La souche *E. coli* XL1-Blue est transformée avec le mélange de ligation selon le protocole décrit précédemment (cf. II] 2)), et le nouveau plasmide, nommé pYC5, est extrait en utilisant le kit « Thermo scientific Gene JET Plasmid miniprep kit » référence : K0502, selon les recommandations du constructeur. Le plasmide pYC5 a été vérifié par restriction puis séquençage du gène *pyrE2*.

Construction du plasmide pYC6

L'ADN génomique d'une culture de *H. salinarum* a été extrait grâce au kit « Thermo scientific DNA, RNA and protein purification » référence : 740952,250. Le protocole utilisé est celui recommandé par le constructeur pour les bactéries. Le gène de la thymidine kinase est amplifié par PCR en utilisant la polymérase Q5 et les amorces à queue flottante RL281 et 282, permettant d'insérer les sites de restriction *EcoRI* et *NdeI*.

Le plasmide pYC5 et le produit de PCR ont été digérés par les enzymes de restriction *EcoRI* et *NdeI*. Ils ont ensuite été purifiés après électrophorèse sur gel d'agarose grâce au kit GeneJET Gel Extraction Kit (#K0691). Le plasmide et l'insert ont été mélangés selon un ratio molaire 1 : 3 et liés grâce à la T4 DNA Ligase. Une bactérie *E. coli* XL1 est transformée avec le mélange de ligation selon le protocole décrit précédemment (cf. II] 2)), et le nouveau plasmide, nommé pYC6, est extrait en utilisant le kit « Thermo scientific Gene JET Plasmid miniprep kit » (#K0502). Après vérification du plasmide par restriction, puis par séquençage, une seconde transformation est effectuée dans la bactérie *E. coli* GM121 (*dam*-). Après extraction du plasmide dans les mêmes conditions que précédemment, cela nous permet d'obtenir un plasmide non méthylé pour la transformation d'*H. volcanii*.

H.volcanii est ensuite transformée selon le protocole décrit en II] 3) pop-in.

IV] MARQUAGE DE L'ADN NEOSYNTHESE

Le marquage de l'ADN s'effectue par incorporation d'un analogue de la thymidine à l'ADN. Une préculture avec 3 mL de YPC + thymidine à partir d'une colonie isolée est incubée une nuit à 45°C à 150 rpm. La préculture est centrifugée le lendemain à 4000 rpm pendant 10 min. Les cellules sont resuspendues dans du YPC frais contenant l'analogue de thymidine souhaité à 100 µM pour atteindre une DO de 0,1 - 0,2. Puis la culture est incubée à 45°C à 150 rpm le temps souhaité. Dans le cas d'un double marquage, les analogues utilisés sont l'IdU et le CldU. L'IdU est ajouté en premier, et le CldU est ajouté par la suite sans lavage de la culture.

V] DETECTION DE L'ADN MARQUE PAR LES ANALOGUES DE LA THYMIDINE

La détection dépend de l'analogue utilisé. Dans le cas de l'EdU, la détection utilise le principe de la chimie-click et est décrit dans le paragraphe ci-dessous (1) EdU). Dans le cas de tous les autres analogues de la thymidine, qui sont des dérivés halogénés de du 2'-Deoxyuridine, la détection s'effectue grâce à un anticorps marqué. Les protocoles présentés sont ceux que j'ai utilisés pour la détection de la BrdU et seront donc orientés vers celle-ci. Des données préliminaires non publiées montrent qu'ils sont également valables pour les autres analogues.

1) EdU

Après une culture en présence d'EdU, l'ADN génomique est extrait grâce au kit NucleoSpin Tissue de chez MACHEREY-NAGEL. Le couplage de l'EdU et du fluorophore (Alexa 488) est réalisé grâce au kit Click-iT Edu de chez molecular probes (C10337). Le mélange réactionnel a été effectué selon les recommandations du constructeur. La réaction de couplage s'effectue avec 20 µL du mélange réactionnel ajouté à environ 500 ng d'ADN contenu dans 25 µL. La réaction s'effectue à température ambiante pendant 30 minutes. Une purification de l'ADN est nécessaire pour éliminer le fluorochrome non greffé à l'ADN, celle-ci s'effectue grâce à une chromatographie d'exclusion (Micro Bio-Spin Column #732-6223) car l'Alexa est retenu sur une colonne de silice à cause de ses charges négatives. La mesure du spectre d'émission se fait grâce à un fluorimètre. L'échantillon correspond à 100 ng d'ADN contenu dans un volume de 100 µL dans une cuve en quartz. L'échantillon est excité à 495 nm et l'on mesure le spectre d'émission entre 505 et 600 nm (le maximum d'émission de l'Alexa 488 est de 518 nm).

2) LES ANALOGUES HALOGENES DE LA THYMIDINE : LE CAS DE LA BRDU

Slot blot

Le Slot blot consiste à déposer de l'ADN sur une membrane de nylon, puis révéler la présence d'analogue incorporé grâce à des anticorps primaires marqués.

100 ng d'ADN génomique, issu d'une culture en présence de BrdU et extrait grâce au kit NucleoSpin Tissue de chez MACHERY-NAGEL, sont resuspendus dans 1 mL de TE. Grâce à une pompe à vide, les 1 mL sont aspirés à travers des fentes, contre lesquelles est placée une membrane de nylon (Hybond N-nylon - 0,45 micron - 82 mm – Amersham #RPN82N) imbibée de tampon SSPE 2X (cf. Hybridation sur colonie). L'ADN est dénaturé grâce au tampon de dénaturation, puis lavé avec la solution de neutralisation. L'ADN ainsi dénaturé est fixé à la membrane par cross-link aux UV (cf. Hybridation sur colonie).

La révélation s'effectue ensuite à la manière d'un western blot : la membrane est incubée une heure à RT dans un tampon PBS-BSA 5%, puis l'anticorps Anti-BrdU primaire marqué A488 (abcam #FM CAB101A) est ajouté au 1/100 pendant 1h à RT. La détection des anticorps s'effectue grâce au ChémiDoc de chez Biorad (Californie, Etas-Unis).

Microscopie sur cellules fixées

L'analogie utilisé pour la microscopie est le BrdU, dont le marquage de l'ADN passe par l'utilisation d'un anticorps marqué, qui nécessite une dénaturation de l'ADN car l'épitope est situé vers l'intérieur de la double hélice de l'ADN. Il est donc nécessaire de travailler avec des cellules fixées.

A partir d'une colonie isolée, une première préculture sur la nuit est effectuée dans 3 mL de YPC supplémenté en thymidine, puis une seconde préculture est effectuée dans 30 mL pour permettre un volume de culture important. La seconde préculture est lavée de la thymidine par centrifugation 5 min à 4000 g, et resuspendue dans du YPC frais.

Une culture de 100 mL contenant du BrdU à 100 μ M estensemencée avec la seconde préculture à DO 0,2. Des prélèvements de 10 mL sont effectués à t = 0 min, 30, 60, 90, 120, 180 min et ON. Les cellules sont lavées du milieu de culture par une centrifugation 10 min à 4000 g, puis resuspendues dans 5 mL de SW-HEPES 18% + 4% formaldéhyde et Incubées 1h à RT (Température ambiante) sur une roue. Les cellules sont placées à 4°C pour quelques jours (il faut les ré-homogénéiser par retournement 1 fois par jour).

Toutes les étapes suivantes sont à réaliser dans des tubes Eppendorf 2 mL, et le surnageant est éliminé uniquement par retournement pour préserver le culot de cellule.

2 mL de chaque prélèvement sont centrifugés pendant 5 min à 6000 rpm, le surnageant est éliminé et les cellules sont resuspendues dans 300 μ L SW18%, dans lequel est ajouté par la suite 1.5 mL d'EtOH 70% (EtOH 60% final) pour les perméabiliser. Les cellules sont centrifugées pour éliminer le surnageant. Les cellules sont lavées trois fois par centrifugation et resuspendues dans 2 mL de SW18%.

Les cellules sont ensuite resuspendues dans 1 300 µl SW18% + 700 µl formamide (35% formamide final) et incubées 1h à 45°C avant d'être à nouveau lavées trois fois dans du PBS 1X. Lors du dernier lavage, les cellules sont resuspendues dans 99 µL de PBS et 1 µL de l'anticorps anti-BrdU (1/100^{ème} final) greffé Alexa 488 et incubées 1h à RT dans le noir. Les cellules sont à nouveau lavées trois fois avec 2 mL de PBS 1X, et lors du dernier lavage resuspendues dans 100 µL. 20 µL de la suspension sont déposés sur un pad d'agar fin, et une fois la goutte sèche, le pad est monté entre une lame et une lamelle pour être observé au microscope. Le microscope utilisé est un ZEISS Axio Observer équipé d'un objectif à immersion à huile 40x, 1.4 NA.

Peignage moléculaire

L'objectif de la manipulation est d'extraire l'ADN des cellules de la manière la plus douce possible pour éviter les cassures. Dès que les cellules sont lysées, l'échantillon est à manipuler avec des gants, à l'abri de la lumière, et les solutions doivent être autoclavées pour protéger l'ADN des DNases. L'extraction de l'ADN se fait au sein d'un plug d'agar, dans lequel sont lysées les cellules et dans lequel l'ADN est purifié. L'ADN est ensuite libéré du plug d'agar, juste avant le peignage et le marquage de l'ADN.

Les cellules sont cultivées en présence de BrdU lors des cas de marquage simple, ou avec un couple de CldU/IdU lors de cas de double marquage. Elle s'effectue à partir d'une préculture diluée à DO 0,2 lavée de thymidine, puis mise en présence de l'analogue pendant le temps souhaité. Les cellules sont lavées du milieu de culture par centrifugation 5 min à 6000 rpm, puis sont resuspendues dans de la SW 18% de façon à obtenir DO 1.

40 µL de cellules sont resuspendues dans 40 µL d'agarose low melting point 1% en fusion (concentration finale 0,5%). Les plugs sont déposés dans des tubes eppendorfs de 2 mL et rincés deux fois 1h dans du tampon Tris-EDTA 50 mM pH 7,4 (TE), puis les protéines ont été digérées dans 1mL de tampon protéinase K (900 µL EDTA 0,5M, 100 µL sarcosyl 10%, 50 µL protéinase K à 20 mg/mL) à 55°C sur la nuit. Le tampon est à remplacer le lendemain matin pour environ 4h. Le plug est ensuite lavé deux fois pendant une heure dans 1mL du TE, puis deux fois dans 30 min à 37°C dans 1mL de TE contenant 1 µg/mL de péfabloc. Le tampon est remplacé par du tampon TE pH 6,5 pendant 1h à 4°C. Le tampon TE pH 6,5 est remplacé par 200 µL de tampon d'agarase, puis les plugs sont chauffés 20 min à 68°C pour les faire fondre. Les blocs sont ensuite refroidis à 42°C et 2U de B-agarase I sont ajoutés pour être incubés sur la nuit. Les échantillons sont

chauffés ensuite 20 min à 60°C pour inactiver l'enzyme. 0,8 µL de YOYO-1 sont ajoutés pour marquer l'ADN. Après l'ajout du YOYO, l'ADN est incubé au moins 30 min dans l'obscurité avant le peignage.

100 µL de l'ADN est prélevé doucement avec un cône coupé (pour élargir le diamètre de l'ouverture afin d'éviter de casser l'ADN), pour le diluer dans 1,5 mL de tampon MES pH 6. L'ADN est transféré dans une cuve par retournement, puis une lamelle silanisée est plongée dans l'ADN pendant 5 min pour permettre aux extrémités de l'ADN de s'attacher, puis remontée doucement pour étirer les fibres d'ADN. A ce stade, la lamelle est à observer au microscope pour vérifier qu'elle est correctement peignée.

La lamelle est mise à sécher 2h à 60°C. Une fois refroidie, l'ADN est fixé par des bains successifs de 3 min dans de l'éthanol à 70, 90 et 100%. Une fois l'éthanol complètement évaporé, la lamelle est baignée dans du NaOH 1N préparé extemporanément, pendant 30 min. La lamelle est rincée par deux bains rapides de PBS, puis par 5 bains de 5 min. La lamelle est ensuite déshydratée par des bains successifs d'éthanol glacé à 70, 90 et 100%. Une fois l'éthanol complètement évaporé, la lamelle est incubée dans une solution de blocage (ROCHE Blocking Reagent #11 096 176 001) pendant 1h à 37°C, puis dans une solution de blocage contenant l'anticorps anti-BrdU chez la souris (abcam #FMCAB101A) au 1/50 pendant 1h à 37°C. La lamelle est lavée 4 fois avec du PBS pendant 5 min puis est incubée dans une solution de blocage contenant l'anticorps secondaire anti-souris au 1/50 (VectorLABORATORIES #DL-2488) pendant 30 min. La lamelle est à nouveau lavée 4 fois avec du PBS pendant 5 min, puis incubée dans une solution de blocage PBS + BSA 1% pendant 1h à 37°C, puis dans la solution de blocage contenant l'anticorps anti-ADN (Merck-Millipore #MAD3034) chez la souris au 1/50 pendant 1h à 37°C. La lamelle est lavée avec du PBS 4 fois 5 min avec du PBS, puis incubée 30 min à 37°C avec l'anticorps secondaire anti souris (Biotium #20155). La lamelle est à nouveau lavée au PBS.

La lamelle est montée sur une lame avec 15 µL de milieu de montage (EverBrite #23001) et fixée avec du vernis. La lamelle est prête à être observée, et peut être stockée à -20°C.

VI] TIME LAPSE

L'objectif est de faire pousser les cellules directement sous le microscope, cela permet de pouvoir imager les cellules individuellement lors de la prolifération.

La culture s'effectue sur un bloc d'agar contenant du milieu de culture et monté entre deux lamelles de verre (Fig. 16). Un rectangle autocollant (Gene Frame Seals, ref AB-0578), servant de moule et permettant de sceller hermétiquement la culture, est fixé sur une lamelle, et 500 μ L de YPC + agar 1% sont coulés à l'intérieur du moule. Une seconde lamelle de verre est placée rapidement au-dessus, avant que le milieu ne se solidifie, afin d'évacuer le milieu excédentaire. Après solidification, la lamelle du dessus est retirée. Une bande de milieu de culture d'environ 5 mm est retirée au centre de la préparation afin de créer une poche d'air, nécessaire à la croissance d'*H. volcanii*. 2 μ L d'une culture à DO 0,1 en phase exponentielle de croissance sont déposés sur le dessus du milieu de culture. Une fois la goutte séchée, le plastique de protection permettant à la seconde lamelle de se sceller est retiré et la seconde lamelle est remplacée par-dessus les cellules.

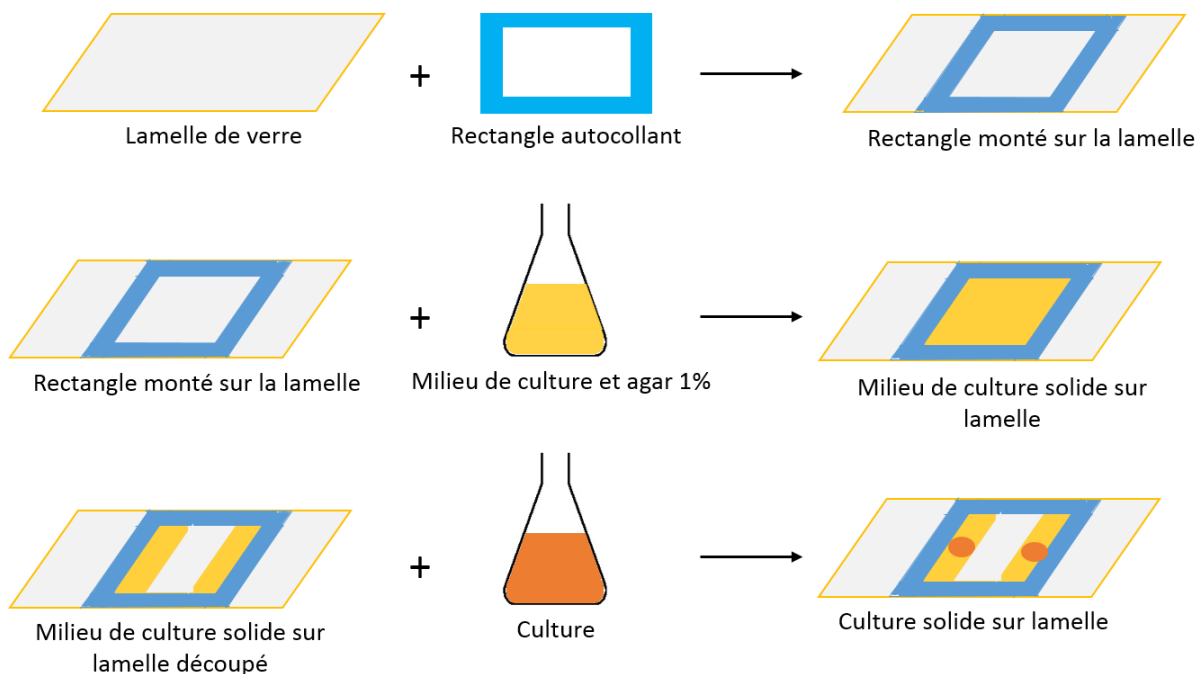


Figure 16 : Schéma explicatif du montage de la culture pour le Time lapse

L'observation s'effectue sous un microscope inversé à champ large (ZEISS Axio Observer équipé d'un objectif à immersion à huile 40x, 1.4 NA) équipé d'une chambre à incubation. Après préchauffage du microscope 2h à 45°C pour éviter que la dilatation des matériaux du microscope ne mène à un décalage dans l'axe des z, et n'affecte l'acquisition. Deux images sont prises toutes les 15 minutes : en DIC, puis en fluorescence en excitant à 490 nm.

Résultats

I] CONSTRUCTION DE SOUCHES PERMETTANT UN MARQUAGE DE L'ADN

Le laboratoire s'intéresse à l'étude des mécanismes liés à la stabilité du génome, et plus particulièrement aux fourches de réplication. Le but est de mieux comprendre leur fonctionnement en étudiant leur dynamique et en identifiant les protéines qui les composent en conditions normales de croissance et en réponse à différents stress cellulaires. Grâce à la microscopie de fluorescence, des protéines de la réplication fusionnées à la protéine verte fluorescente (GFP) sont exprimées pour permettre l'étude de leur localisation dans les cellules vivantes. Un variant de la GFP, smRS-GFP, possédant un décalage spectral vers le rouge et adapté à de fortes concentrations en sel (Reuter and Maupin-Furlow 2004), est utilisé chez *H. volcanii*. Cela a notamment permis de montrer que l'hélicase/nucléase Hef est recrutée aux fourches de réplication arrêtées (Lestini et al. 2013). Lors de mon arrivée au laboratoire, l'étude de la localisation de la protéine de fixation à l'ADN simple-brin RPA2 fusionnée à la GFP était en cours dans le cadre de la thèse de Floriane Delpech (2016).

Ces souches exprimant des protéines fusionnées à la smRS-GFP sont des outils permettant l'étude de la localisation de ces protéines au sein de cellules vivantes. Elles permettent également d'étudier le comportement de ces protéines suite à un stress réplcatif (inhibition de l'ADN polymérase ou dommages de l'ADN). Cependant, toutes les protéines étant marquées, dans le cas où seulement une sous-population est impliquée dans le processus étudié, il peut s'avérer difficile de la distinguer. Dans le cas de la fusion GFP::RPA2, RPA2 étant à la fois impliquée dans la réparation et la réplication de l'ADN, il est difficile de déterminer pour lequel de ces deux rôles la protéine est recrutée à la chromatine par microscopie. Ainsi, développer un nouvel outil pour étudier la dynamique de réplication permettrait d'obtenir à la fois des résultats complémentaires ou inaccessibles à l'étude de la réplication par le marquage des protéines. Une autre approche possible pour appréhender ces mécanismes de réplication est le marquage spécifique de l'ADN néosynthétisé. Ce type de marquage permet :

- L'étude de la localisation de l'ADN néosynthétisé en lui-même, de la même façon que les protéines fusionnées à la GFP. Cela permet l'étude de sa localisation cellulaire en conditions normales de croissance, et en réponse à différents stress réplcatifs pour comprendre comment cela influe sur la synthèse de l'ADN.

- Des expériences de co-localisation de protéines marquées avec l'ADN néosynthétisé. Ces expériences de co-localisation peuvent confirmer la position de ces protéines à la fourche de réplication, mais aussi permettre de savoir si ces protéines sont localisées à chaque fourche.

- D'isoler les régions néosynthétisées et les protéines associées, en immunoprécipitant l'ADN néosynthétisé. L'immunoprécipitation de l'ADN néosynthétisé à partir de cellules fixées permettrait d'identifier et quantifier par spectrométrie de masse les protéines situées à la fourche de réplication dans les différentes conditions de croissance étudiées, ainsi que d'identifier les régions chromosomiques par séquençage, permettant de révéler d'éventuels points chauds d'arrêt de la réplication selon les stress répliatifs étudiés (P. Agudelo Garcia et al. 2019).

La localisation de l'ADN néosynthétisé est classiquement réalisée par un marquage de l'ADN grâce à l'incorporation d'analogues de la thymidine, dont la détection peut se faire grâce à un anticorps ou *via* Chimie click. Pour cela, il nous faut disposer d'une souche ou de conditions de culture permettant cette incorporation. Afin de mesurer la capacité d'*H. volcanii* à intégrer à son ADN les analogues de la thymidine, une culture à partir d'une colonie isolée de la souche de laboratoire H26 ($\Delta pyrE2$, considérée comme sauvage concernant la réplication : WT) a été incubée une nuit en présence de thymidine. La culture a ensuite été lavée de la thymidine par centrifugation et suspendue dans un milieu de culture contenant de la bromodéoxyuridine (BrdU) (100 μ M). L'ADN de plusieurs prélèvements effectués à 0, 5, 15, 30, 45 et 60 minutes de culture a été purifié grâce à une colonne de silice (*via* le kit NucleoSpin Tissue de chez MACHEREY-NAGEL). 100 μ g d'ADN de chaque prélèvement ont été déposés sur une membrane de nylon (Slot Blot), et l'ADN a été dénaturé par traitement à l'hydroxyde de sodium puis fixé sur la membrane grâce à un *cross-link* aux UV. La présence de BrdU a été révélée grâce à un anticorps primaire anti-BrdU couplé à une molécule d'Alexa 488 (Fig. 17a).

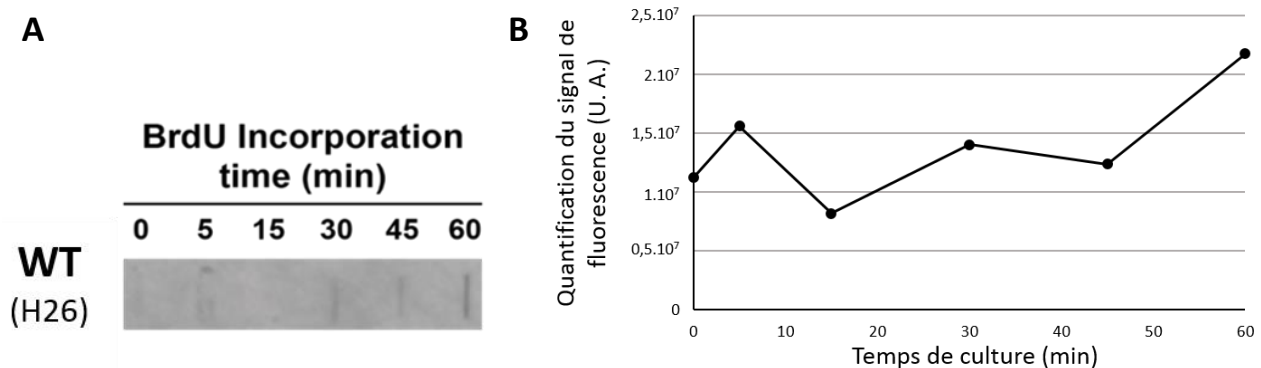


Figure 17 : Mesure de la capacité de la souche H26 à incorporer la BrdU à son ADN. (A) Slot Blot mesurant la capacité de la souche H26 à intégrer à son ADN la BrdU en fonction du temps de culture. (B) Quantification de l'intensité de fluorescence de la BrdU de chaque condition en fonction de sa concentration et du temps de culture.

On peut observer sur le Slot Blot l'apparition d'un léger signal vers 30 minutes de culture. Lorsque l'on mesure l'intensité du signal de fluorescence pour chaque prélèvement (Fig. 17b), on observe une fluctuation de l'intensité du signal à un niveau très faible, puis une augmentation après 60 minutes de culture. On peut conclure de cette expérience que chez *H. volcanii* l'incorporation des analogues de la thymidine est peu efficace.

Il est donc indispensable de construire une souche permettant une meilleure incorporation des analogues de la thymidine pour obtenir un signal plus intense dans un temps plus court. Pour cela, la voie de biosynthèse de la thymidine a été inactivée. *H. volcanii* possède une voie de récupération des pyrimidines, ce qui permet aux cellules de récupérer la thymidine présente dans le milieu de culture pour permettre la synthèse d'ADN. En remplaçant la thymidine du milieu par un analogue, cela devrait permettre une incorporation efficace de l'analogue dans l'ADN synthétisé.

1) CONSTRUCTION D'UNE SOUCHE CAPABLE D'INCORPORER EFFICACEMENT LES ANALOGUES DE LA THYMININE

Dans la voie de biosynthèse *de novo* de la thymidine, le stock de déoxy-uridine-monophosphate (dUMP) est utilisé comme précurseur par la thymidylate synthase (Hts). Grâce au dUMP et à un donneur de carbone, le méthylène-tétrahydrofolate, la thymidylate synthase catalyse la production de déoxy-thymidine-monophosphate (dTMP), qui sera ensuite phosphorylé avant d'être incorporé à l'ADN (Myllykallio et al. 2018). Dans le cas d'*H. volcanii*, le méthylène-tétrahydrofolate est ainsi converti en dihydrofolate qui doit être régénéré en tétrahydrofolate, puis en méthylène tétrahydrofolate pour pouvoir être utilisé de nouveau comme donneur de carbone. La première étape de régénération du dihydrofolate s'effectue par l'action de la dihydrofolate réductase (HdrB) (Ortenberg, Rozenblatt-Rosen, and Mevarech 2000).

Une souche d' *Haloferax volcanii* auxotrophe pour la thymidine a déjà été construite dans la littérature, dans le but de se servir de cette auxotrophie comme marqueur de sélection lors des clonages (Ortenberg, Rozenblatt-Rosen, and Mevarech 2000). *H. volcanii* possède deux dihydrofolate réductases différentes : *hdrA* et *hdrB*. Seule la délétion de *hdrB* rend la souche auxotrophe pour la thymidine, sans retard de croissance associé lorsque le milieu de culture contient de la thymidine (Ortenberg, Rozenblatt-Rosen, and Mevarech 2000). L'action de la thymidylate synthase et de la dihydrofolate réductase est présentée dans la figure ci-dessous (Fig. 18b).

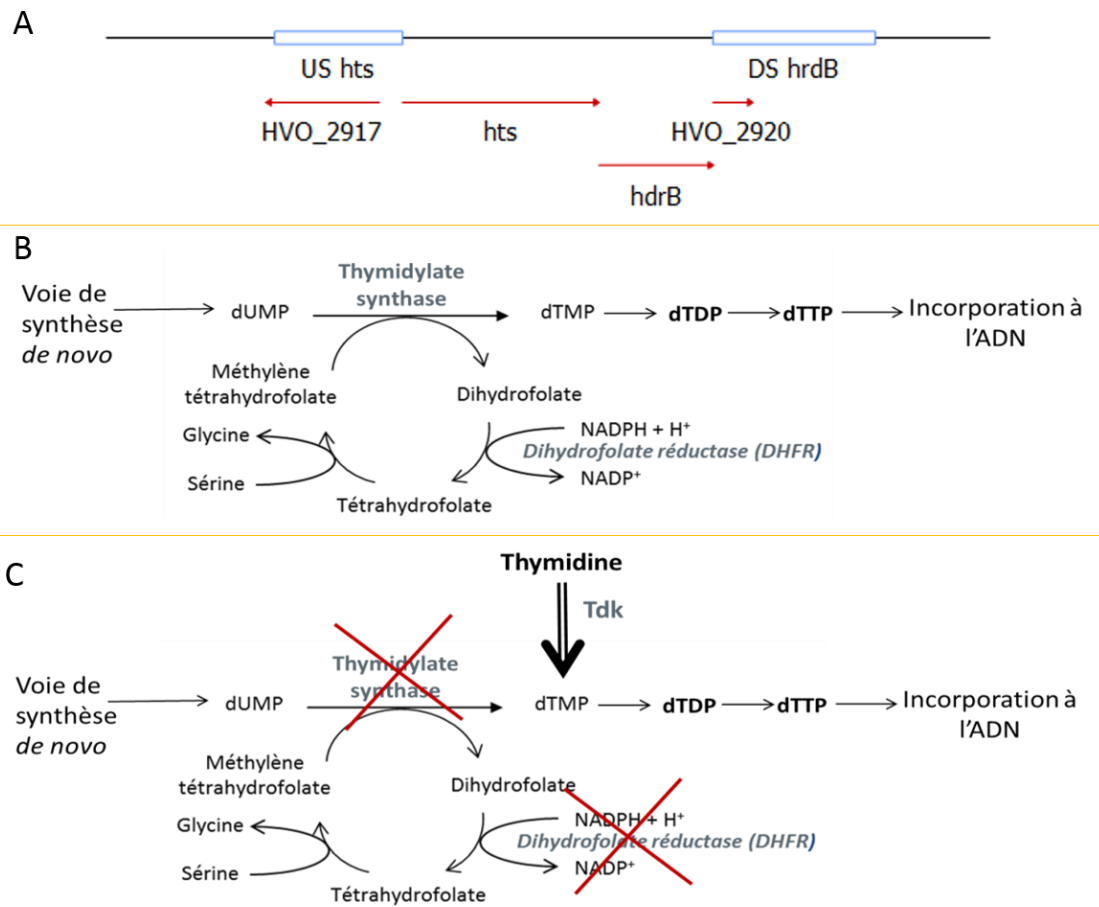


Figure 18 : Présentation de l'action de la délétion de *hts* et *hdrB*. (A) Région chromosomique des gènes *hts* et *hdrB*. (B) Voie de biosynthèse *de novo* de la déoxy-thymidine-monophosphate (dTMP) centrée sur l'action de la thymidylate synthase et de la dihydrofolate réductase. (C) Voie de biosynthèse de la déoxy-thymidine-monophosphate (dTMP) résultant de la délétion de la thymidylate synthase et de la dihydrofolate réductase, grâce à la thymidine kinase (Tdk).

Au laboratoire, j'ai construit une souche auxotrophe pour la thymidine en délétant les gènes de la thymidylate synthase (*hts*) et de la dihydrofolate réductase (*hdrB*), qui sont organisés en opéron (Fig. 18a). Dans une souche $\Delta hts \Delta hdrB$, la création du stock de dTMP n'est plus possible que par la voie de sauvetage, qui correspond à la récupération de la thymidine du milieu extracellulaire. La thymidine ainsi récupérée est convertie en dTMP grâce à l'action de la thymidine kinase (Tdk), puis phosphorylée pour être incorporée à l'ADN (Fig. 18c). L'ajout d'analogue de la thymidine dans le milieu de culture devrait ainsi permettre son incorporation dans l'ADN par la même voie que la thymidine.

La souche $\Delta hts \Delta hdrB$ (HvYC0) a été construite grâce au clonage dans le plasmide pTA131 (Fig. 19a) de la région amont (US) de *hts* et de la région aval (DS) de *hdrB* (plasmide pRL55, Fig. 19b), puis par insertion-excision de ce plasmide dans l'ADN génomique de la souche H26 grâce à la méthode du *pop-in/pop-out*

(Bitan-Banin et al., 2003). L'absence des gènes *hts* et *hdrB* dans les colonies issues du pop-out a été détectée par hybridation sur colonie en utilisant un fragment du gène *hdrB* comme sonde. Les colonies portant la délétion sont celles ne présentant pas de signal lors de l'hybridation sur colonie (Fig. 19c). Le pourcentage de colonies présentant la délétion est de 33% (33 colonies sur 100 testées). L'auxotrophie pour la thymidine de deux colonies ainsi sélectionnées a été confirmée par l'absence de colonies après striage sur milieu riche (YPC) ne contenant pas de thymidine. Un clone a ensuite été conservé et correspond à la souche $\Delta hts \Delta hdrB$ nommée HvYCO.

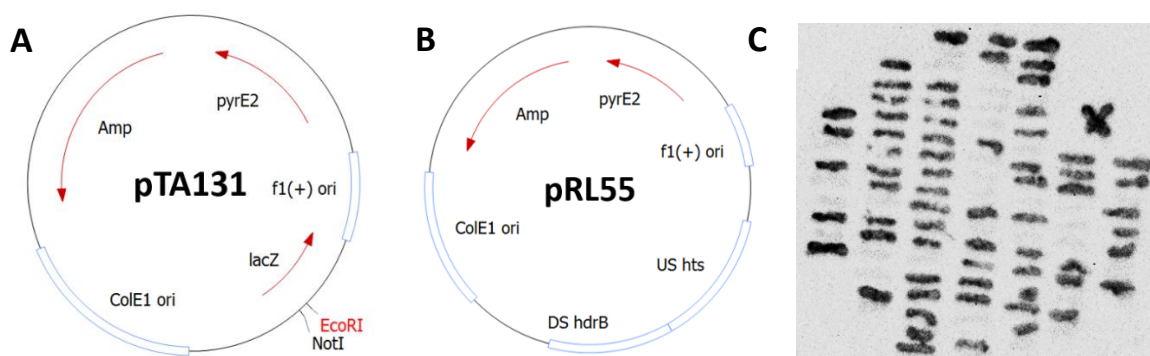


Figure 19 : Présentation de la délétion des gènes *hts* et *hdrB*. (A) Carte du plasmide pTA131. (B) Carte du plasmide pRL55. (C) Hybridation sur colonie après insertion/excision de pRL55 dans H26. La détection d'un signal reflète la présence des gènes *hts* *hdrB*.

Nous avons tout d'abord testé l'efficacité de la souche à récupérer la thymidine présente dans le milieu de culture. Pour cela, nous l'avons mise en culture en présence de différentes concentrations de thymidine (Fig. 20a) et suivi la croissance en mesurant la densité optique à 600 nm. Nous pouvons constater que la concentration minimale de thymidine permettant une croissance identique à la concentration habituellement utilisée (165 μ M) est 8,25 μ M, ce qui correspond au même ordre de grandeur que dans le mutant de la thymidylate synthase $\Delta thyA$ de *E. coli* (Ahmad, Kirk, and Eisenstark 2002). De plus, on observe que la souche est capable de croître pendant approximativement 240 minutes (4 heures) sans avoir besoin de thymidine, ce qui nous obligera à envisager la possibilité d'une période de sevrage.

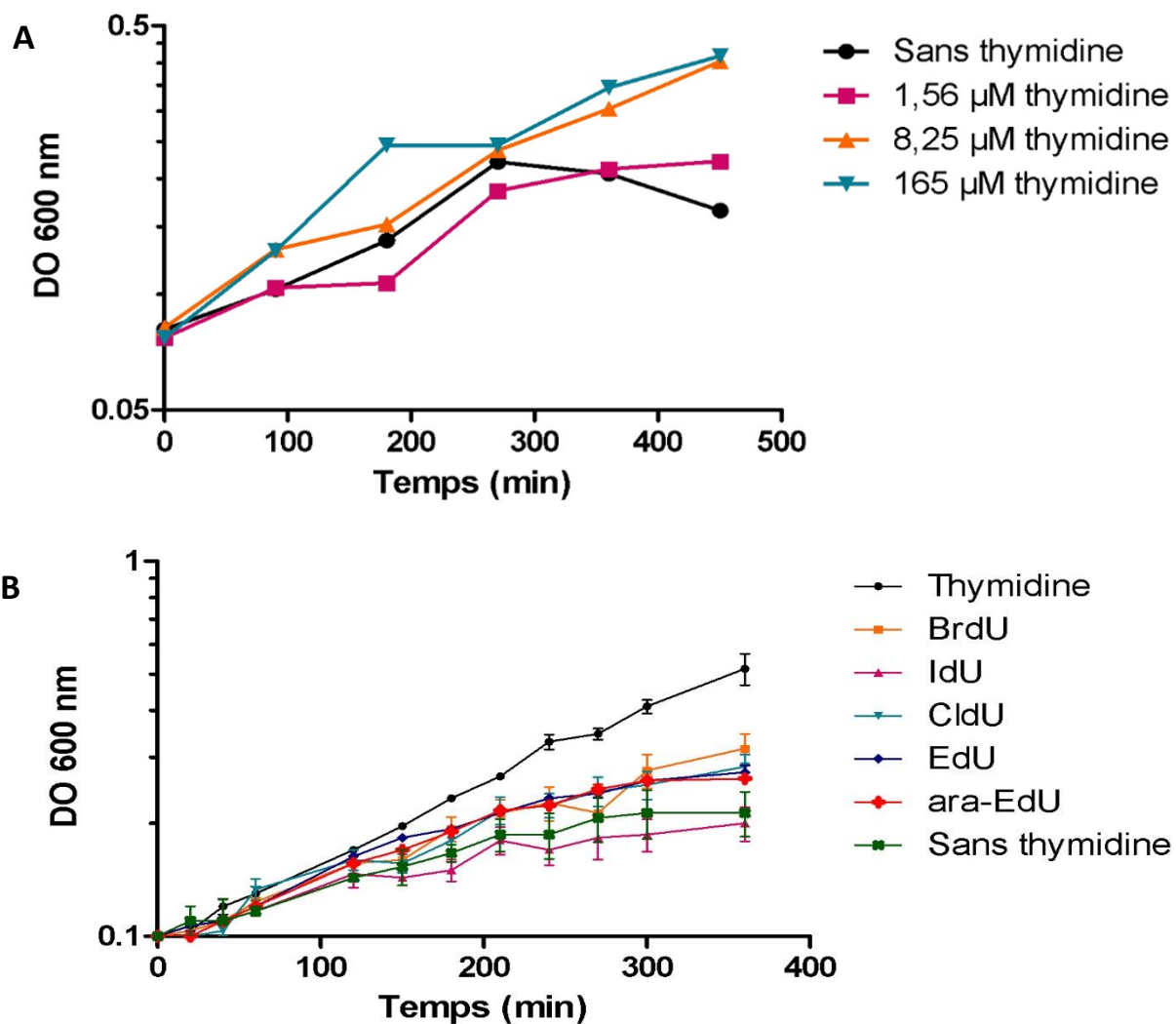


Figure 20 : Résultats préliminaires : Suivi de croissance de cultures de la souche $\Delta hts \Delta hdrB$ (HvYC0) par mesure de la densité optique à 600 nm. (A) En fonction de la quantité de thymidine présente dans le milieu de culture. (B) En fonction de la thymidine ou de ses analogues de la thymidine (100μM) présents dans le milieu de culture.

La souche incorporant efficacement la thymidine, il faut déterminer quel analogue est le plus adapté au marquage de l'ADN. Les analogues de la thymidine peuvent être classés en deux groupes :

- Les dérivés halogénés de la thymidine, comprenant le BrdU, l'IdU, le CldU et le FdU. Ces analogues nécessitent l'utilisation d'un anticorps, qui peut être couplé à un fluorophore pour leur détection, ainsi qu'une dénaturation de l'ADN.
- L'EdU, qui est un analogue de la thymidine permettant de lui greffer une large gamme de molécules (fluorophores, streptavidine...) par Chimie-click, en utilisant un catalyseur de cuivre I entre un azide et un alcyne permettant la création d'un pontage covalent triazole entre les deux molécules. L'avantage de l'EdU est qu'il ne nécessite pas de dénaturer l'ADN pour utiliser la Chimie-click. Nous avons également testé l'ara-

EdU, qui correspond à un dérivé de l'uridine qui est moins toxique que l'EdU mais conservant les mêmes propriétés (Neef and Luedtke 2011).

La capacité à proliférer de la souche $\Delta hts \Delta hdrB$ (HvYC0) a été testée lors d'une culture en présence de ces différents analogues, excepté le FdU, par un suivi de la densité optique à 600 nm. Pour cela, une culture à partir d'une colonie isolée de la souche HvYC0 a été incubée une nuit en présence de thymidine, puis la culture a été lavée de la thymidine par centrifugation et resuspendue dans des milieux de culture contenant chacun un analogue (à une concentration de 100 μ M). Un témoin positif contenant 165 μ M de thymidine et un témoin négatif sans thymidine ont été ajoutés aux cultures pour les comparer à la croissance en présence d'analogue. La culture en présence de thymidine présente la croissance la plus élevée, alors que la culture sans thymidine pousse plus lentement (Fig. 20b). Les cultures en présence de BrdU, de CldU, d'EdU et d'ara-EdU présentent une croissance intermédiaire entre les deux conditions contrôles, avec le BrdU présentant la meilleure croissance, suivi du CldU, de l'EdU, puis de l'ara-EdU. La culture en présence d'IdU présente une croissance équivalente à la condition sans thymidine. On constate donc que les analogues de la thymidine ont un impact négatif sur la croissance de la souche $\Delta hts \Delta hdrB$ (HvYC0), que l'on peut associer soit à une incorporation moins efficace à l'ADN, soit à un stress cellulaire déclenché par l'incorporation de ces analogues dans l'ADN. On constate cependant que cet effet a lieu après environ 120 minutes de culture en présence des analogues. Un temps de culture court devrait nous affranchir de cet effet cytotoxique.

J'ai donc choisi de me focaliser sur l'utilisation de deux analogues en particulier : l'EdU pour sa polyvalence et le fait que l'ADN n'ait pas besoin d'être dénaturé, et le BrdU car c'est l'analogue qui présente le moins d'effet cytotoxique.

Incorporation de l'EdU à l'ADN

Dans un premier temps, j'ai cherché à savoir s'il était possible de détecter la présence d'EdU incorporé à l'ADN de la souche $\Delta hts \Delta hdrB$ (HvYC0). Pour cela, j'ai effectué une culture à partir d'une colonie isolée dans du YPC supplémenté en thymidine. La culture est ensuite lavée de la thymidine par centrifugation, qui est remplacée par 100 μ M d'EdU. Cette culture est incubée pendant une nuit afin que la souche puisse incorporer un maximum d'EdU à son ADN, puis l'ADN génomique a été extrait grâce à une colonne de silice. J'ai greffé grâce au kit « Click-iT EdU » une molécule d'Alexa 488 sur l'EdU. L'ADN étant en suspension, j'ai mesuré l'émission sur une plage de 500 à 600 nm grâce à un fluorimètre. Dans un premier temps, j'ai obtenu

un signal présentant un maximum d'émission à 517 nm (maximum d'émission de l'Alexa 488) dans tous mes échantillons, et ce pour toutes les conditions, témoins négatifs inclus. Les répliques de cette manipulation montrent que pour une condition de croissance donnée, l'intensité du signal collecté est très variable, allant parfois du simple au double. Les résultats présentés figure 21b correspondent à des exemples représentatifs des données obtenues. On peut voir par exemple, pour l'expérience présentée, que les conditions sans EdU donnent un signal plus fort que dans la condition avec EdU.

Collecter un signal indiquant la présence de l'Alexa 488 dans le témoin négatif laisse entrevoir trois possibilités : soit l'Alexa se greffe de manière non spécifique, scénario peu probable car l'un des intérêts de la chimie click est justement sa spécificité car on ne retrouve pas dans le vivant de groupe azide ni de groupe alcyne, soit l'on mesure un signal qui ne provient pas de l'Alexa, soit les étapes de lavage sont mal effectuées. Afin de tester la seconde hypothèse, l'absorption à 517 nm de tous les tampons a été mesurée, mais aucun signal n'a été détecté. En s'intéressant à la structure de la molécule d'Alexa 488, on se rend compte qu'elle possède plusieurs charges négatives (Fig. 21a). La purification de l'ADN après chimie-click se faisant grâce à une colonne de silice, et donc grâce à ses charges négatives, on peut émettre l'hypothèse que la molécule d'Alexa est également retenue sur la silice, et éluée en même temps que l'ADN. J'ai donc changé de principe de purification pour passer à une purification par chromatographie d'exclusion, séparant les molécules en fonction de leur taille. Dans la figure 21c, les deux courbes correspondent au même échantillon, purifié soit par colonne de silice, soit par gel d'exclusion. Dans le cas d'une purification par gel d'exclusion, le signal mesuré par le fluorimètre est perdu dans toutes les conditions de culture.

Il est également intéressant de noter que la condition « EdU » dans la figure 21b et « ADN purifié par colonne de silice » de la figure 20c correspondent aux mêmes conditions expérimentales, ce qui témoigne de la grande variabilité de l'intensité du signal obtenu lors des répliques, et ce pour toutes les conditions testées.

Nous avons maintenant des conditions expérimentales dans lesquelles notre témoin négatif est bien négatif, mais il nous faut conclure que nous ne sommes pas capables de détecter un signal nous permettant de conclure à la présence de l'EdU dans l'ADN. J'ai cherché un témoin positif pour disposer de conditions expérimentales dans lesquelles il serait possible d'obtenir un signal spécifique de l'EdU et des conditions de culture dans lesquelles l'EdU est détectable.

Comme témoin positif, mes tests de culture avec une souche d'*E. coli* $\Delta thyA \Delta deoA$ disponible au laboratoire ont montré un faible signal à 517 nm (maximum d'émission de l'Alexa 488). J'ai essayé d'obtenir la souche eCOMB (Pham et al. 2013), qui correspond à une souche d'*Escherichia coli* optimisée pour l'incorporation des analogues de la thymidine, afin de m'en servir comme témoin positif, mais l'équipe ayant publié cette souche n'a jamais répondu à ma demande.

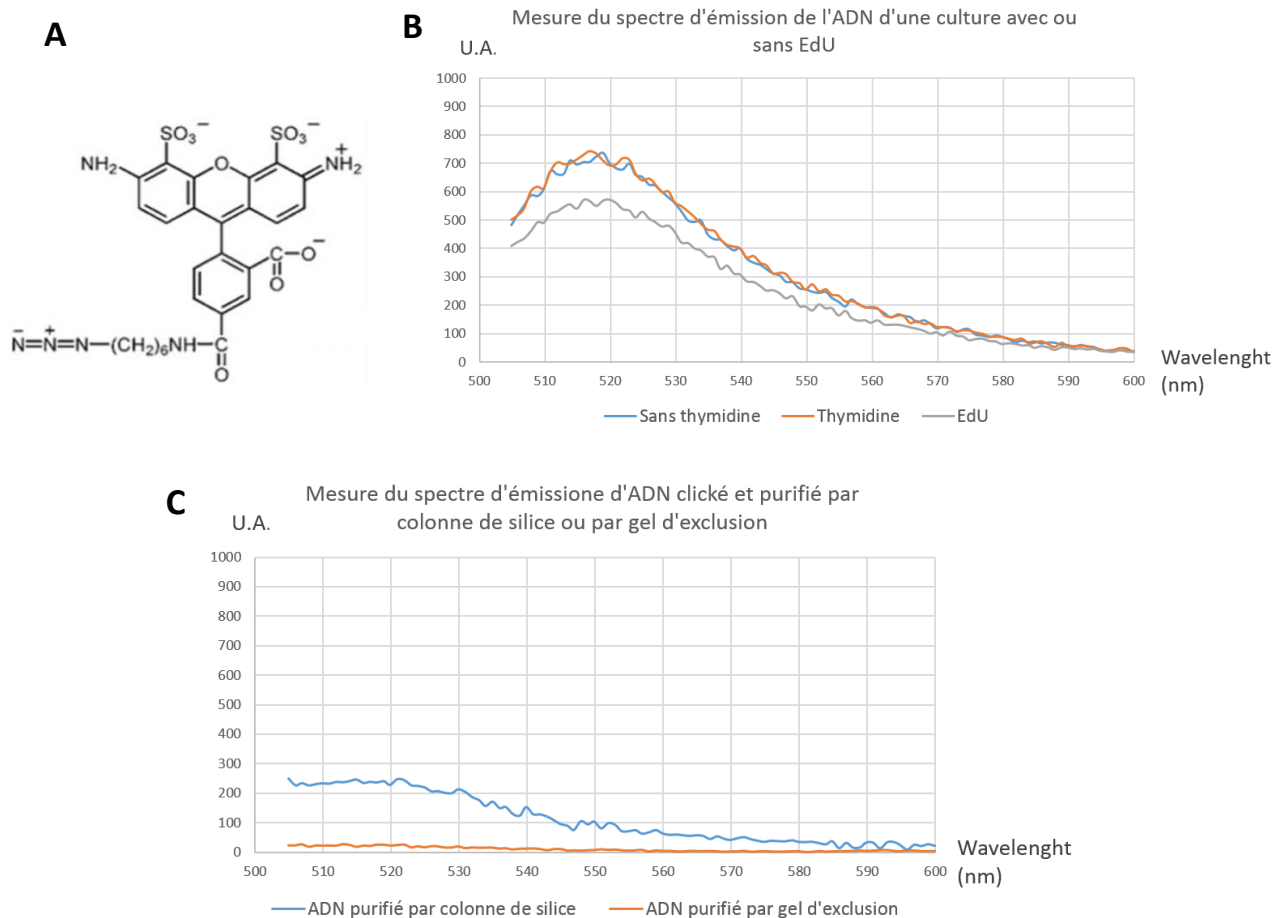


Figure 21 : Mesure de l'efficacité d'incorporation de l'EdU par la souche HvYCO. (A) Structure de la molécule d'Alexa 488. (B) Mesure de l'émission d'une suspension d'ADN après chimie-click avec de l'Alexa 488 et purification par colonne de silice. (C) Mesure de l'émission d'une suspension d'ADN après chimie-click avec de l'Alexa 488 et purification soit par colonne de silice (bleu), soit par un gel d'exclusion (orange).

J'ai alors essayé d'optimiser les conditions de culture pour *H. volcanii* dans le but de détecter un signal spécifique de l'EdU. Pour cela, différentes conditions ont été testées:

- une période de sevrage de 4h en thymidine avant l'ajout de l'EdU,
- de doubler la concentration de l'EdU (200 μ M),
- des temps de culture jusqu'à la phase de latence,
- des temps de culture court (5 à 15 minutes) afin de minimiser l'effet cytotoxique éventuel de l'EdU
- une culture en milieu casa (qui n'est pas un milieu riche),
- une culture en présence à la fois de thymidine et de EdU,

- une culture en présence d'inhibiteur de la synthèse des pyrimidines (uridine et déoxyguanosine).

Aucune de ces conditions n'a permis de détecter la présence d'EdU dans l'ADN.

Un témoin positif ne présentant qu'un faible signal empêche d'exclure la possibilité que l'absence de signal soit due à un problème technique lié à la réaction de chimie click. Mais il est toutefois très probable que l'absence de signal reflète bien l'absence d'EdU dans l'ADN, soit parce que l'EdU est dégradé avant ou après son incorporation à l'ADN, soit parce qu'il n'est pas incorporé ; ou une incorporation transitoire entraînant un effet cytotoxique empêchant sa détection. Il m'a été suggéré d'utiliser l'ara-EdU lors de la culture cellulaire à la place de l'EdU, qui correspond à un dérivé de l'uridine qui est moins toxique que l'EdU mais conservant les mêmes propriétés (Neef and Luedtke 2011). Cependant, le suivi de croissance en présence de cet analogue montre un retard de croissance comparable à celui obtenu avec l'EdU (Fig. 20b).

Incorporation d'analogues halogénés de la thymidine à l'ADN

Comme pour l'EdU, j'ai dans un premier temps cherché à détecter la présence de BrdU dans l'ADN d'*H. volcanii* à partir d'ADN purifié, puis de déterminer quelle concentration en BrdU devrait être utilisée pour la suite des manipulations. Enfin, j'ai déterminé quel était le temps minimal de culture en présence de BrdU pour obtenir un signal détectable. Je me suis pour cela inspiré du protocole d'hybridation sur colonies (Cf. matériel et méthode).

A partir d'une colonie isolée de la souche $\Delta hts \Delta hdrB$ (HvYC0), plusieurs cultures ont été ensemencées dans un milieu supplémenté en thymidine. Après une nuit, les cultures ont été lavées de la thymidine par centrifugation et resuspendues dans différents milieux contenant 0, 20, 50, 100 ou 200 μM de BrdU. J'ai effectué des prélèvements après 0, 30, 60 et 120 minutes de culture et ai extrait l'ADN de ces prélèvements grâce à une colonne de silice. 100 ng d'ADN ont été déposés sur une membrane de nylon (Slot blot). Après dénaturation de l'ADN et fixation par *cross-link* aux UV, la quantité de BrdU incorporée à l'ADN a été révélée grâce à un anticorps primaire anti-BrdU couplé à une molécule d'Alexa 488, et le signal de fluorescence obtenu a été mesuré grâce à un ChemiDoc de chez Biorad (Fig. 22a).

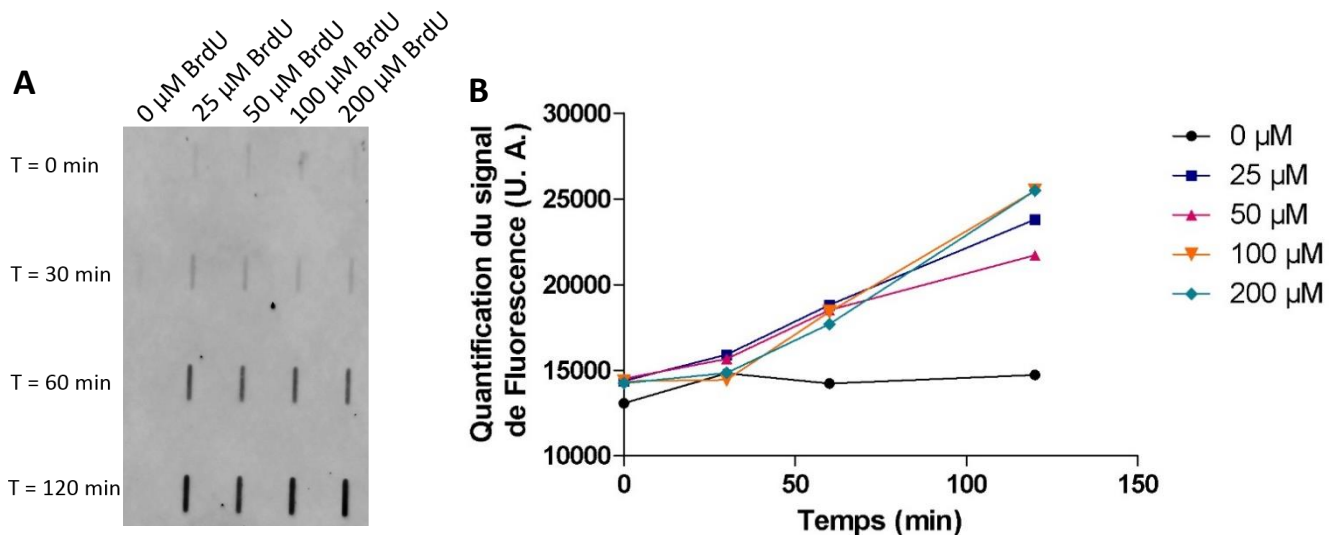


Figure 22 : Résultats préliminaires : Détermination de la concentration optimale de BrdU. (A) Slot blot avec 100 ng d'ADN ayant incorporé de la BrdU, et révélé avec un anticorps anti-BrdU marqué pour 0, 30, 60 120 min de culture. (B) Quantification de l'intensité de signal obtenu par Slot Blot.

Dans la figure 22a, on constate une absence de signal BrdU dans la condition témoin sans BrdU, et un signal augmentant à la fois en fonction du temps de culture et de la concentration en BrdU. L'intensité du signal de chaque condition a été mesurée et reportée sur le graphique 22b. Après 30 minutes, on constate une apparition de signal principalement dans les conditions 25 et 50 µM de BrdU. A 60 minutes de culture, tous les échantillons contenant de la BrdU présentent une augmentation significative du signal de fluorescence, et à 120 minutes de culture on constate que l'intensité maximale du signal est atteinte pour des concentrations de 100 et 200 µM de BrdU. On en déduit que 100 µM correspond à la concentration minimale permettant d'obtenir un signal maximum. C'est donc cette condition qui sera utilisée pour la suite des manipulations.

Il reste à déterminer quel est le temps de culture minimal requis pour obtenir un signal de BrdU détectable avec cette concentration. La figure 22 nous permet d'observer qu'un temps de 30 minutes permet d'avoir un signal détectable, des prélèvements avant 30 minutes de culture sont donc nécessaires.

Une culture en présence de 100 µM de BrdU a donc été faite, et l'ADN de prélèvements à 0, 5, 15, 30, 45 et 60 minutes de culture a été extrait. 100 ng d'ADN ont été déposés, dénaturés et fixés aux UV sur la membrane de nylon pour chaque condition, puis le signal de fluorescence du marquage avec un anticorps anti-BrdU marqué par une molécule d'Alexa 488 a été mesuré pour chaque dépôt (Fig. 23).

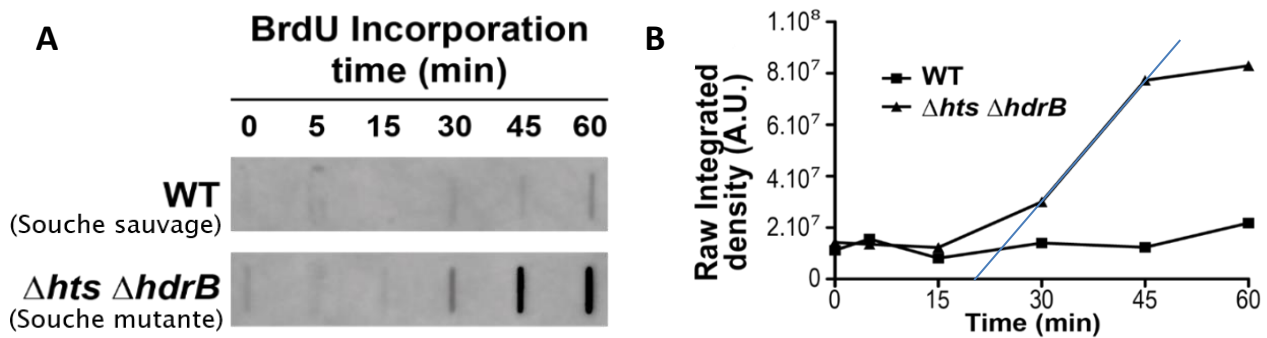


Figure 23 : Mesure du temps de culture minimal avant la détection du BrdU. (A) Slot blot avec 100 ng d'ADN ayant incorporé de la BrdU (100 μ M), et révélé avec un anticorps anti-BrdU marqué pour une culture de 0, 5, 15, 30, 45 et 60 min. (B) Quantification de l'intensité de fluorescence de la BrdU de chaque condition en fonction de sa concentration et du temps de culture. La droite en bleue permet d'estimer le début de l'incorporation de la BrdU dans l'ADN.

Les résultats présentés figure 23 comparent la souche sauvage *hts*⁺ *hdrB*⁺ (H26) à la souche $\Delta hts \Delta hdrB$ (HvYC0). Comme présenté figure 17, on constate que la souche sauvage n'incorpore que peu efficacement la BrdU à son ADN. Pour la souche $\Delta hts \Delta hdrB$ (HvYC0), dans ces conditions expérimentales, un signal de fluorescence apparaît à partir de 30 minutes, et augmente avec le temps de culture. On peut conclure de ces résultats qu'un signal détectable apparaît entre 15 et 30 minutes de culture (Fig. 23a). Pour chaque prélèvement, l'intensité du signal a été mesurée et reportée sur le graphique 23b. Comparée à la souche sauvage *hts*⁺ *hdrB*⁺ (H26), la souche $\Delta hts \Delta hdrB$ (HvYC0) présente une nette amélioration de l'incorporation du BrdU d'environ un facteur 10. En traçant la tangente à la pente, on peut estimer que dans ces conditions expérimentales, l'incorporation de BrdU peut commencer à être détectée après 20 minutes de culture environ. Bien que cette expérience ne soit pas suffisante pour déterminer de manière fiable à quel moment le BrdU commence à être incorporé à l'ADN, elle permet néanmoins d'estimer le temps de latence avant la reprise de la croissance après lavage de la thymidine, qui correspond à une donnée à prendre en compte dans l'estimation de la quantité de BrdU incorporée selon le temps de croissance en présence de l'analogie.

J'ai également essayé d'optimiser les conditions de culture pour *H. volcanii* dans le but de détecter un signal BrdU plus précocement. Pour cela, les différentes conditions de culture testées pour l'EdU ont également été testées pour la BrdU :

- une période de sevrage de 4h en thymidine avant l'ajout du BrdU,
- doubler la concentration de BrdU (200 μ M),

- une culture en milieu casa (qui n'est pas un milieu riche),
- une culture en présence à la fois de thymidine et de BrdU,

L'incorporation de BrdU a été mesurée par Slot blot selon les conditions précédentes. Aucune de ces conditions n'a permis d'améliorer l'incorporation de BrdU dans l'ADN.

2) CONSTRUCTION DE SOUCHES PERMETTANT UNE ETUDE APPROFONDIE DE LA REPLICATION

Ayant validé que la délétion des gènes *hts* et *hdrB* permet une incorporation plus efficace de la BrdU, plusieurs mutants permettant l'étude de la réplication chez *H. volcanii* déjà disponibles au laboratoire ont été rendus auxotrophes pour la thymidine pour permettre le marquage de leur ADN.

Nous souhaitons construire une souche *gfp::rpa2 Δhts ΔhdrB* pour localiser à la fois RPA2 et l'ADN néosynthétisé. Ainsi, la délétion *Δhts ΔhdrB* a été réalisée dans la souche *gfp::rpa2* par *pop-in/pop-out*. 16% des colonies issues du *pop-out* portaient la délétion attendue (8/50) (Fig. 24a). L'auxotrophie pour la thymidine de deux colonies ainsi sélectionnées a été confirmée par l'absence de colonies après striage sur milieu riche (YPC) ne contenant pas de thymidine. Un clone a ensuite été conservé et correspond à la souche *gfp::rpa2 Δhts ΔhdrB* nommée HvYC1.

Par ailleurs, nous souhaitons étudier la dynamique de la réplication en absence des origines de réplication. Ainsi, de la même façon, la délétion *Δhts ΔhdrB* a été réalisée dans la souche *Δori* (H1804). 20% des colonies issues du *pop-out* portaient la délétion attendue (10/50) (Fig. 24b). L'auxotrophie pour la thymidine de deux colonies ainsi sélectionnées a été confirmée par l'absence de colonies après striage sur milieu riche (YPC) ne contenant pas de thymidine. Un clone a ensuite été conservé et correspond à la souche *gfp::rpa2 Δhts ΔhdrB* nommée HvYC4.

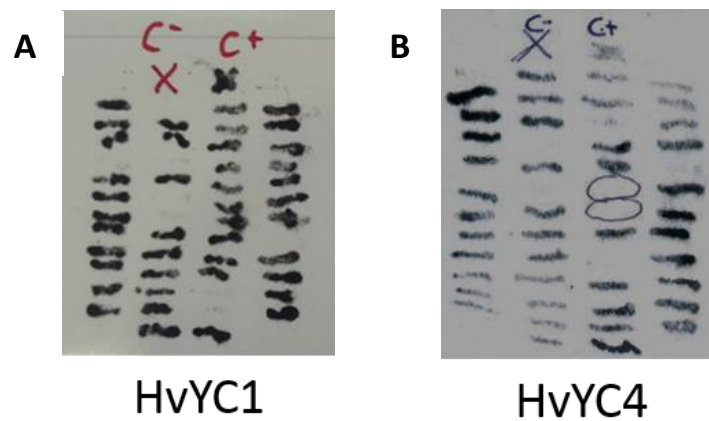


Figure 24 : Résultats de l'hybridation sur colonie pour sélectionner la délétion de *hts* et *hdrB* dans les souches (A) *gfp::rpa2* (HvFD1) et (B) Δori (H1804). Les colonies WT apparaissent en noir et les colonies portant la délétion correspondent aux stries non révélées.

3) OPTIMISATION DE L'INCORPORATION DES ANALOGUES DE LA THYMININE

L'optimisation de l'incorporation des analogues de la thymidine a pour but de répondre à deux questions :

- Est-il possible d'améliorer l'incorporation d'EdU par la souche $\Delta hts \Delta hdrB$ (HvYC0) pour nous permettre d'obtenir un signal détectable?
- Est-il est possible d'améliorer l'incorporation de BrdU pour réduire le temps nécessaire la détection du signal BrdU ?

Ces deux questions nous permettent d'étudier plus finement l'initiation de la réplication. De par l'avantage que confère l'EdU, et par le fait que moins le temps nous séparant de l'initiation est important, plus les observations seront précises.

Il existe dans la littérature une souche d'*E. coli* optimisée pour l'incorporation des analogues de la thymidine : la souche eCOMB, dans laquelle deux enzymes ont été supprimées : l'enzyme YjjG et l'enzyme DeoA (Pham et al. 2013). YjjG est une nucléotidase spécifique des bases non canoniques. DeoA est une enzyme catalysant une réaction réversible de phosphorylation spécifique des pyrimidines, impliquée soit dans leur dégradation pour leur utilisation en tant que source de carbone et d'énergie, soit dans la voie de sauvetage des pyrimidines. Ces deux enzymes tendent à éloigner les analogues de la thymidine de leur incorporation à l'ADN. Leur place dans la voie métabolique de la thymidine est présentée figure 25. Grâce à

la délétion de ces deux enzymes, la souche eCOMB incorpore les analogues de la thymidine 18 fois plus efficacement que la souche sauvage (Pham et al. 2013).

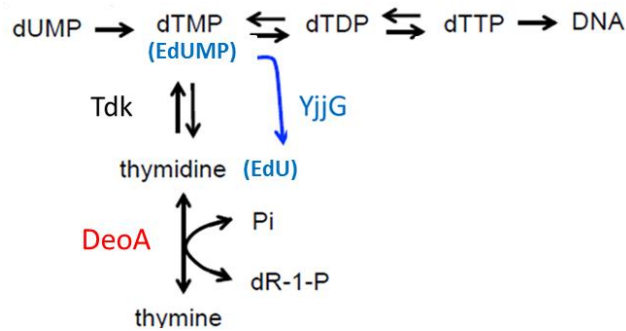


Figure 25 : Voie de sauvetage de la thymidine chez la souche eCOMB (Pham et al. 2013), l'action de YjjG est présentée avec comme exemple l'EdU (bleu).

Par recherche d'homologie de ces deux gènes chez *H. volcanii*, j'ai identifié un candidat potentiel pour *deoA*, *HVO_0965* (Figure 26), et deux candidats potentiels pour *yjjG*, *HVO_1415* (Figure 27) et *HVO_2370* (Figure 28).

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	115 bits(289)	2e-32	Compositional matrix adjust.	110/409(27%)	182/409(44%)	29/409(7%)
DeoA <i>E. coli</i>	8	IRKKRDGHALSDEEIRFFINGIRDNTISEGQIAALAMTIFFDHMTMPERVSLTMMRDSG	67			
DeoA <i>H. vo</i>	87	IRKK D L +E+ + + D +++ ++ A + + ++M E + LT +M D G	146			
DeoA <i>E. coli</i>	68	TVLDWKS LHLNGPIV-DKHSTGGV-GDVTSLMLGPMVAACGGYIPMISGRGLGHTGGTLD	125			
DeoA <i>H. vo</i>	147	ETVAWEE-----PVIADKHSIGGVAGNRVTPILVPIVAAAAGLKIPKTSRAVTSAAAGTAD	201			
DeoA <i>E. coli</i>	126	KLESIPGFDIFPDDNRFREII-KDVGVAIIGQTSSLAPADKRFYATRDITATVDSIPLIT	184			
DeoA <i>H. vo</i>	202	AMEVL--CDVAFSVAEIRDIVGKTGGCLVWGGAVNLSPPVDDRIIRA-ETPLSIDPKGQLI	258			
DeoA <i>E. coli</i>	185	ASILAKKLAEGLDALVMDVKVGSFAMPTYELSEALAEIIVGVANGAGVRTTALLTDMNQ	244			
DeoA <i>H. vo</i>	259	ASVLSKKKSAGSTNVVDIPYEGGANVESLAKARELAKDFNRVGDHLGMAVECAITNGGA	318			
DeoA <i>E. coli</i>	245	VLASSAGNAVEVREAVQFLTGEYRNPRLFDVTMALCVEMLISGKLAKDDAEARAKLQAVL	304			
DeoA <i>H. vo</i>	319	PVGRGVPVLEAREVLATLAG--GGPNDLRVKAIRLADLLFESVGVVDADA-----AEIL	370			
DeoA <i>E. coli</i>	305	DNGKAAEVFGRMVAQKGPDTFVENYAKYLPTAMLTKAVYADTEGFVSEMDTRALGMVAV	364			
DeoA <i>H. vo</i>	371	DSGQAEETFREILAAQNGDPDV---EAADLSPGRHTVAVRADRDGVTHTVNNRLVNEVA-	426			
DeoA <i>E. coli</i>	365	AMGGGRRQASDTIDYSVGFDTMARLGDQVDGQRPLAVIHAKDENNWQEA	413			
DeoA <i>H. vo</i>	427	-----RRAGAPRDPGAGLELHRRVGEAASGETLFTVHAESEDKLADA	469			

Figure 26 : Alignement de la séquence protéique de DeoA de *E. coli* avec la séquence protéique de *HVO_0965* (DeoA). L'alignement a été fait avec le site NCBI.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
65.9 bits(159)	9e-18	Compositional matrix adjust.	48/161(30%)	76/161(47%)	6/161(3%)
YjjG <i>E. coli</i>	67	RFESWAERLNVEPGKLNNEAFINAMAEICTPL-PGAVSLLNAIRGNAKIGIITNGFSALQQ			125
<i>HVO_1415</i>	67	RVAAKHDREGVDVRALARGFVETVDHSAVSFRPGAEEAALAAARDHASVGLVTNGPERRQA			126
YjjG <i>E. coli</i>	126	VRLERTGLRDYFDLLVISEEVGVAKPNNKIFDYALEQAGNPDRSRVLMVGDTAESDILGG			185
<i>HVO_1415</i>	127	VKLDALGIADAFDAVVFAGDMPRRKPHDPDFDRALSDDL-DAEANASLHVGDSELEFDVDGA			185
YjjG <i>E. coli</i>	186	INAGLATCWLNAHHREQ----PEGIAPTWTVSSLHELEQLL	222		
<i>HVO_1415</i>	186	HRAGLDAAWCPVETGDEGDPDPTSYAPAYVLRSLTEFSTIL	226		

Figure 27 : Alignement de la séquence protéique de YjjG de *E. coli* avec la séquence protéique de HVO_1415 (YjjG). L'alignement a été fait avec le site NCBI.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
67.0 bits(162)	3e-18	Compositional matrix adjust.	33/115(29%)	65/115(56%)	3/115(2%)
YjjG <i>E. coli</i>	77	VEPGKLNNEAFINAMAEICTPLPGAVSLLNAIRGNAKIGIITNGFSALQQVRLERTGLRDY			136
<i>HVO_2370</i>	70	VDPERVATAYRERITDAVVPVEGVEAMLAGLRTTYRVGLLTNGPVVAQEAKIDKLGWRDH			129
YjjG <i>E. coli</i>	137	FDLLVISEEVGVAKPNNKIFDYALEQAGN-PDRSRVLMVGDTAESDILGGINAGL	190		
<i>HVO_2370</i>	130	FDTALVTGALPAGKPDGRAFEALDDLGTAPDET--VYVGDSVHHDIAGAHDAGL	182		

Figure 28 : Alignement de la séquence protéique de YjjG de *E. coli* avec la séquence protéique de HVO_2370 (YjjG). L'alignement a été fait avec le site NCBI.

Ces gènes ont été délétés avec succès chez *H. volcanii* dans la souche $\Delta hts \Delta hdrB$ (HvYC0) par *pop-in/pop-out*. Le plasmide pYC1, plasmide intégratif contenant les régions US et DS du gène *deoA*, a permis de déléter *deoA*. Sur 100 colonies, le taux de colonies portant la délétion $\Delta deoA$ est de 46% et a permis de sélectionner la souche $\Delta hts \Delta hdrB \Delta deoA$ nommée HvYC5 (Fig. 29a). Le plasmide pYC2, contenant les régions US et DS du gène *HVO_1415*, a permis de déléter *HVO_1415*. Le taux de colonies portant la délétion *HVO_1415* est de 22 % et a permis de sélectionner la souche $\Delta hts \Delta hdrB \Delta HVO_1415$ nommée HvYC6 (Fig. 29b). La souche comportant la délétion $\Delta hts \Delta hdrB \Delta HVO_2370$ n'a pas pu être construite car nous n'avons pas réussi à construire le plasmide permettant la délétion de *HVO_2370* par *pop-in/pop-out*.

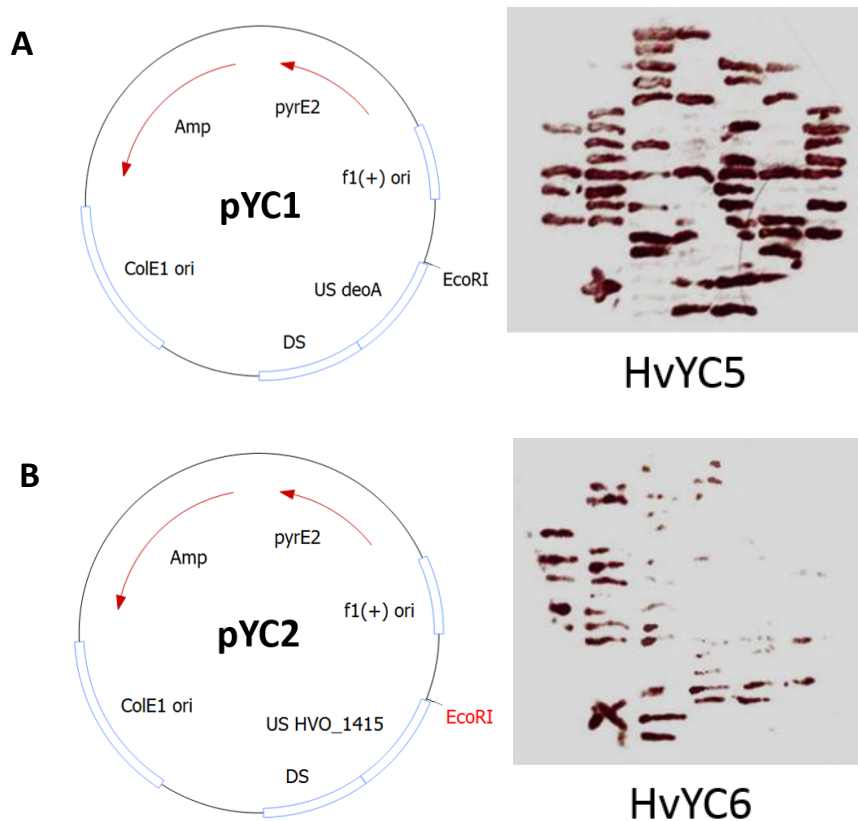


Figure 29 : Présentation de la délétion des gènes *deoA* et *HVO_1415*. (A) Plasmide pYC1 et hybridation sur colonie de la souche $\Delta hts \Delta hdrB$ (HvYC0) rendue $\Delta deoA$ (HvYC5). (B) Plasmide pYC2 et hybridation sur colonie de la souche $\Delta hts \Delta hdrB$ (HvYC0) rendue ΔHVO_1415 (HvYC6). Les colonies WT apparaissent en noir et les colonies portant la délétion correspondent aux stries non révélées.

La capacité de ces souches à pousser en présence d’analogues de la thymidine ainsi que la mesure de la capacité d’incorporation de la BrdU ont été mesurées dans les mêmes conditions que précédemment. Les résultats sont présentés figure 30. On constate que les souches $\Delta hts \Delta hdrB \Delta deoA$ (HvYC5) et $\Delta hts \Delta hdrB \Delta HVO_1415$ (HvYC6) présentent un ralentissement de croissance en présence de BrdU. Une incorporation de la BrdU moins efficace que la souche $\Delta hts \Delta hdrB$ (HvYC0) est observée pour ces deux souches, la souche $\Delta hts \Delta hdrB \Delta HVO_1415$ (HvYC6) présentant l’incorporation la moins efficace (Fig. 30). Ces deux mutants ne seront pas retenus pour la suite de cette étude. La souche eCOMB qui a servi de modèle pour ces délétions possède toutes ces mutations, on pourrait envisager de construire une souche portant à la fois la délétion $\Delta deoA$ et ΔHVO_1415 .

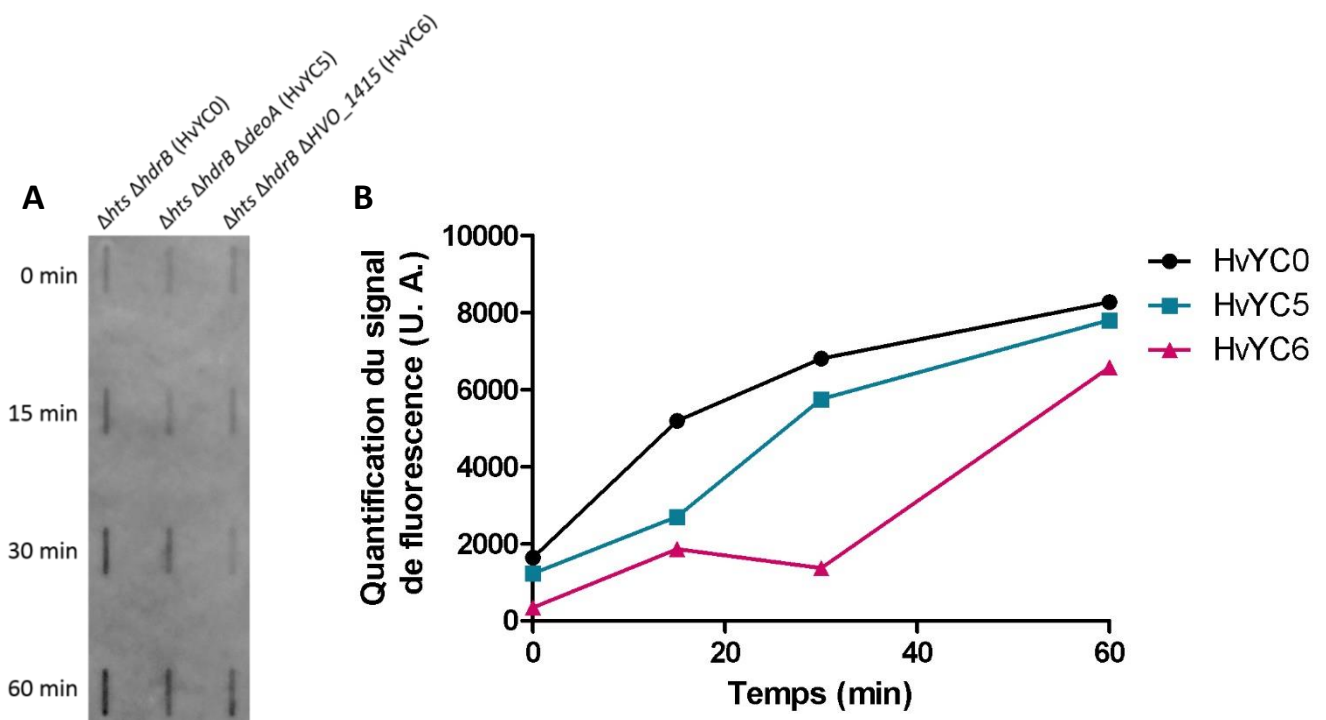


Figure 30 : Résultats préliminaires : mesure de l'efficacité d'incorporation des analogues de la thymidine des souches HvYC5 et HvYC6. (A) Slot blot avec 100 ng d'ADN ayant incorporé de la BrdU (100 μ M), et révélé avec un anticorps anti-BrdU marqué pour une culture de 0, 15, 30 et 60 min. (B) Quantification de l'intensité de fluorescence de la BrdU de chaque condition en fonction de sa concentration et du temps de culture.

4) SUR-EXPRESSION DE LA THYMININE KINASE

La thymidine kinase est une enzyme clef de la voie de récupération des pyrimidines. Son expression seule suffit à créer une voie de récupération chez des organismes qui en sont initialement dépourvus (Gristwood et al. 2012). *H. volcanii* possède une thymidine kinase (*HVO_RS18695*) ce qui lui permet d'avoir une voie de sauvetage des pyrimidines et d'incorporer les analogues de la thymidine. La surexpression de la thymidine kinase permettrait de créer dans la cellule un stock plus important d'analogues de la thymidine phosphorylés et favoriser leur incorporation dans l'ADN. La surexpression de la thymidine kinase chez *H. volcanii* peut se faire en modifiant le promoteur de la thymidine kinase sur le génome, ou en plaçant le gène codant la thymidine kinase sur un plasmide sous contrôle d'un promoteur fort. Pour des raisons de simplicité, c'est cette seconde option qui a été choisie : cela permet de transformer n'importe quelle souche d'*H. volcanii* avec ce plasmide pour obtenir une surexpression de la thymidine kinase. Cependant, afin d'éviter des phénomènes de recombinaison homologue, il est impossible de sur-exprimer la thymidine kinase si le gène est à la fois présent sur le chromosome et sur le plasmide. J'ai donc cherché chez un autre organisme

halophile une séquence de thymidine kinase compatible, c'est à dire possédant une forte similarité de séquence protéique, mais possédant une faible similarité de séquence nucléotidique. J'ai ainsi sélectionné la thymidine kinase d'*H. salinarum* qui présente 76% d'identité avec celle d'*H. volcanii* mais ne présente que peu de similarité de séquence nucléique (Fig.31).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
322 bits(824)	1e-118	Compositional matrix adjust.	149/195(76%)	171/195(87%)	0/195(0%)
Tdk <i>H. vo</i> 1	MHAITQSGWIEVISGSMFSGKTEELLRRLRRAEIQEISVFKPQLDDRYGETTVGSHAG				60
Tdk <i>H. sa</i> 1	MHAITSGW+EVI+GSMFSGKTEELLRRLRRAEIQ+++ P +DDRYGE T+GSHAG				60
Tdk <i>H. vo</i> 61	RSWEASVVPSEGEVWQIAEELNGEDVVAIDEANFFSAELVDVCEALAADGKRVVVS				120
Tdk <i>H. sa</i> 61	RSWAATVVEPTAEGVASIPTLLNGEQVVAIDEANFFPAELVDVCQELAADGRRVLS				120
Tdk <i>H. vo</i> 121	QTFRAEPFDPLPQLMALAEYVDKLAICTLCGEPATRNQRLIDGEPAHVDDPTILVGAEE				180
Tdk <i>H. sa</i> 121	QTFREPF+P+PQLMA+AEYVDK++AIC CGEPATRNQRLI+GEPAH DDPT++VGAEE				180
Tdk <i>H. vo</i> 181	SYEARCRNCHTLRRD	195			
Tdk <i>H. sa</i> 181	+YEARCRNCH +RR+ TYEARCRNCHVVRRE	195			

Figure 31 : Alignement de la séquence protéique de la thymidine kinase de *H. volcanii* avec la séquence protéique de la thymidine kinase de *H. salinarum*.

Le plasmide pTA962 (Fig. 32a) est un plasmide permettant la sur-expression de protéines car le site multiple de clonage est placé derrière le promoteur fort et inductible au tryptophane *p.tnaA*, mais il possède comme marqueur de sélection chez *H. volcanii* le gène *pyrE2* permettant la synthèse de *nov*o de l'uracile, et le gène *hdrB* permettant la synthèse de *nov*o de la thymidine. Nous avons donc construit un dérivé de pTA962 dépourvu du gène *hdrB*. Pour cela, le fragment NcoI-AflIII contenant *pyrE2* et *hdrB* a été remplacé par un fragment NcoI-AflIII ne contenant que *pyrE2* obtenu par PCR (Fig. 32b). Après vérification par séquençage du gène *pyrE2*, le plasmide pYC4 ainsi obtenu a pu être utilisé pour la surexpression de la thymidine kinase de *H. salinarum* en clonant le gène de la thymidine kinase sous contrôle du promoteur inductible au tryptophane. La séquence de la thymidine kinase d'*H. salinarum* a été amplifiée par PCR à partir d'ADN génomique, en utilisant les amorces RL282 et RL283 pour ajouter les sites de restriction *EcoRI* et *NdeI* permettant son insertion dans le plasmide pYC4 (Fig. 32c). Les cartes plasmidiques, vérifiées par restriction et séquençage, sont présentées ci-dessous :

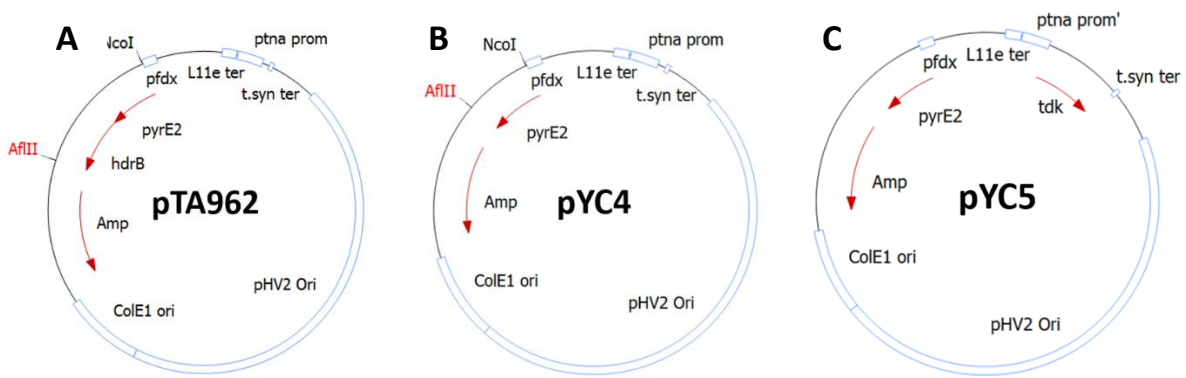


Figure 32 : Carte des plasmides pTA962 (Allers et al. 2010), pYC4 et pYC5.

Le plasmide pYC5 a été transformé dans la souche $\Delta hts \Delta hdrB$ (HvYC0) pour obtenir la souche $\Delta hts \Delta hdrB$ p-*tdk*+(*Hsa*) nommée HvYC7. A partir d'une colonie isolée, une préculture a été ensemencée dans un milieu riche supplémenté en thymidine. Après une nuit, la culture a été lavée de la thymidine par centrifugation et resuspendue dans du milieu de culture contenant 100 μ M de BrdU puis divisée en deux pour permettre l'ajout dans l'une uniquement de 5 mM de tryptophane pour permettre l'activation du promoteur inductible en amont du gène de la thymidine kinase. Des prélèvements ont été faits à 0, 15, 30 et 60 minutes de culture, et l'ADN de ces prélèvements a été extrait. Suivant le même protocole que précédemment, 100 ng d'ADN ont été déposés sur une membrane de nylon, et après dénaturation de l'ADN et fixation par cross-link aux UV, la quantité de BrdU intégré à l'ADN a été révélée grâce à un anticorps primaire anti-BrdU marqué par une molécule d'Alexa 488. Le signal obtenu a été mesuré grâce à un ChemiDoc de chez Biorad (Fig. 33).

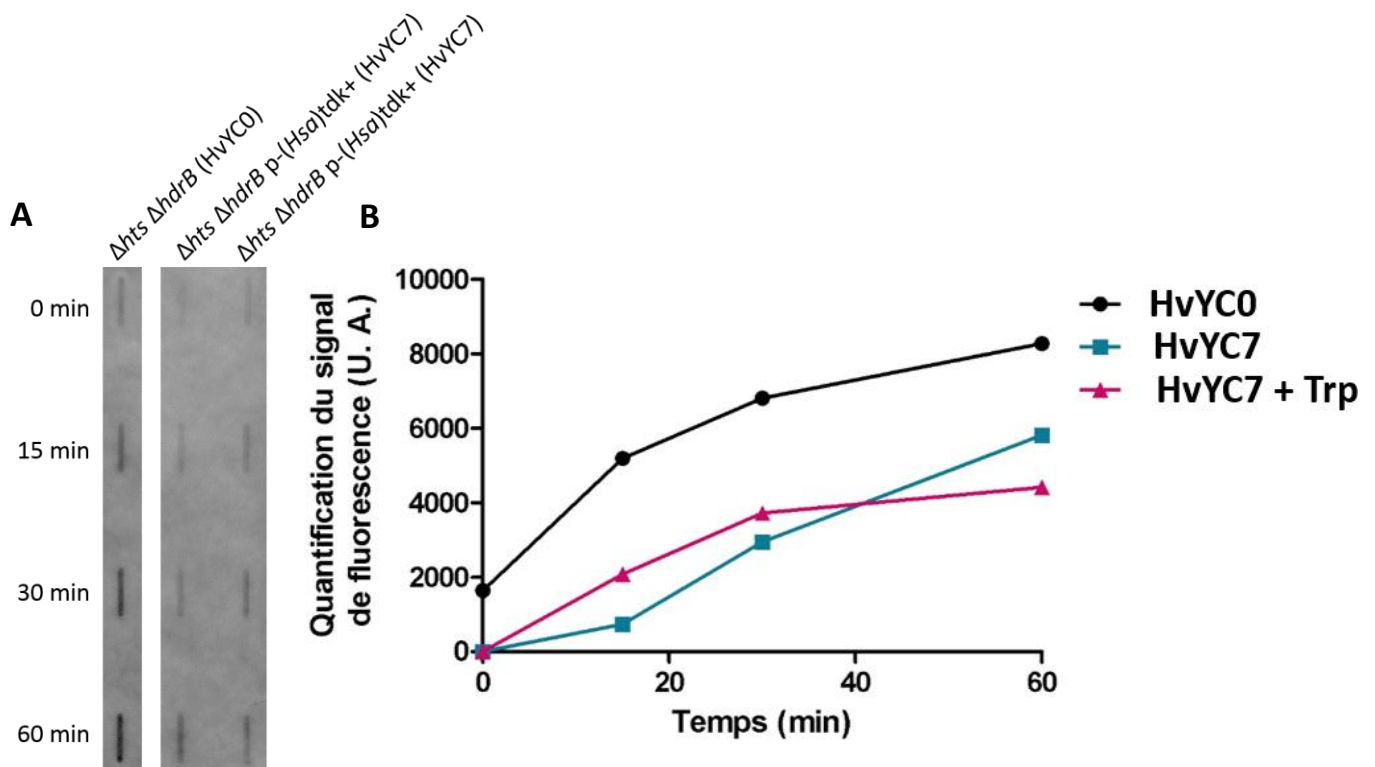


Figure 33 : Résultats préliminaires : mesure de l'efficacité d'incorporation des analogues de la thymidine de la souche $\Delta hts/hdrB p-(Hsa)tdk+$ (HvYC7). (A) Slot blot avec 100 ng d'ADN ayant incorporé de la BrdU (100 μ M), et révélé avec un anticorps anti-BrdU marqué pour une culture de 0, 15, 30 et 60 min. (B) Quantification de l'intensité de fluorescence de la BrdU de chaque condition en fonction de sa concentration et du temps de culture.

On constate dans la figure 33a la présence d'un signal dans toutes les conditions, qui augmente en fonction du temps de culture. La quantification du signal (Fig. 33b) nous révèle que la souche contenant le plasmide permettant l'expression de la TDK d'*H. salinarum*, en présence ou en absence d'inducteur, présente un signal plus faible que la condition contrôle $\Delta hts \Delta hdrB$ (HvYC0). Cette souche n'a donc pas été retenue pour la suite de cette étude car n'incorporant pas la BrdU de manière plus efficace. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ce résultat : le niveau d'expression de la protéine n'est pas suffisant, elle n'est pas correctement repliée au sein du cytoplasme de *H. volcanii*, ou elle n'est pas active.

II] LOCALISATION DE L'ADN NEOSYNTHETISE ET DETERMINATION DU NOMBRE DE SITES DE REPLICATION DANS LA CELLULE

Dans un effort de compréhension des mécanismes liés à la stabilité du génome chez l'archée *H. volcanii*, dans le cadre de la thèse de Floriane Delpech, la protéine RPA2, SSB impliquée dans la réplication et la réparation chez *H. volcanii* (Skowrya, 2011), a été fusionnée à la GFP afin d'étudier sa localisation dans la cellule (thèse de Floriane Delpech, 2016).

Il a été montré que la souche exprimant la protéine RPA2 fusionnée à la GFP présente un temps de croissance comparable à la souche sauvage. Par ailleurs, la survie des cellules exprimant la protéine GFP::RPA2 est comparable à la survie des cellules exprimant RPA2 en réponse à des dommages de l'ADN (exposition aux UVs ou à la phléomycine qui provoque des cassures double brin de l'ADN (Delmas, Duggin, and Allers 2013)) et en réponse à un stress réplcatif (inhibition de la réplication par exposition à l'aphidicoline (P. Forterre, Elie, and Kohiyama 1984)). Ces résultats montrent que la protéine de fusion GFP::RPA2 est fonctionnelle.

L'étude de la localisation de la protéine GFP::RPA2 a donc été réalisée dans des cellules en phase exponentielle de croissance et en phase stationnaire. On observe dans les cellules en phase exponentielle de croissance une localisation ponctuelle de RPA2, avec en moyenne $2,76 \pm 0,12$ foyers par cellule. Dans des cellules en phase stationnaire, le nombre de foyers BrdU par cellule diminue à $2,10 \pm 0,2$ foyers par cellule, avec une majorité de cellule ne présentant qu'un seul foyer. Dans les deux conditions, la proportion relative de cellules selon le nombre de foyers observé (de zéro à 9 foyers par cellule) suit une distribution de Poisson. Cette distribution de Poisson du nombre de foyers indique qu'elle suit une loi de probabilité discrète décrivant le comportement d'un nombre d'évènements d'un phénomène lié au hasard, c'est-à-dire une répartition stochastique des fourches de réplication d'une cellule à une autre responsable de cette variabilité du nombre de foyers observé au sein d'une population, qui est ici visible grâce à l'observation de cellules individuelles. L'observation des foyers par super résolution SIM révèle une taille apparente des foyers RPA2 présentant une forte variabilité, de 50 nm à 300 nm, avec une moyenne à 150 nm. Cette taille est au-dessus de la limite de résolution du microscope, ce qui signifie que la taille apparente correspond à la taille réelle de l'objet observé. Cette taille est du même ordre de grandeur que la taille des foyers de réplication eucaryotes mesurés par microscopie électronique (Koberna et al. 2005). Lorsque les cellules sont traitées avec de l'aphidicoline ou de la phléomycine, le nombre de foyers de RPA2 augmente significativement. Tandis que la taille des foyers observés après exposition des cellules à l'aphidicoline n'est pas significativement différente à celle mesurée dans les cellules en condition normales de croissance, les foyers de GFP::RPA2 formés en réponse aux cassures à l'ADN générées par la phléomycine apparaissent significativement plus petits, avec une taille mesurée d'environ 100 nm.

Les foyers GFP::RPA2 observés dans les cellules en phase exponentielle de croissance soulèvent plusieurs questions : Pourquoi observe-t-on une variabilité de cellule à cellule du nombre de foyers de RPA2 ? Correspondent-ils à des foyers de réplication active comme le suggèrent les résultats obtenus ? Si ce sont des foyers de réplication, et au vu de la polyplœidie d'*H. volcanii*, pourquoi y-a-t-il aussi peu de foyers ?

La localisation de l'ADN néosynthétisé par incorporation de BrdU et immunodetection grâce à la souche HvYC0 a permis d'apporter une partie de la réponse. Dans une culture en phase exponentielle de croissance qui a poussé en présence de BrdU, des prélèvements ont été effectués à 30, 60, 120 et 180 minutes de culture. Ces cellules ont été fixées au formaldéhyde, perméabilisées à l'éthanol, et l'ADN a été dénaturé au formamide pour permettre l'immunomarquage de la BrdU. Cela a permis d'observer des foyers bien localisés à l'intérieur de la cellule, sans localisation particulière apparente. On observe l'apparition d'en moyenne un peu plus d'un foyer de BrdU dès 30 minutes de culture, et jusqu'à en moyenne plus de deux foyers par cellule à 180 minutes de culture (Fig. 34a). Ces résultats sont très semblables à ceux obtenus avec la fusion GFP::RPA2, et confortent l'hypothèse selon laquelle les foyers RPA2 correspondent à des zones de réplication active. Par ailleurs, on constate que dès 30 minutes de culture, environ 90% des cellules possèdent au moins un foyer de BrdU, ce qui indique que la réplication est active dans près de 90% des cellules dès 30 minutes de culture (Fig. 34b).

L'ensemble de ces résultats ont été publiés au cours de ma thèse dans l'article qui suit, dont Floriane Delpech et moi-même sommes co-premiers auteurs. Intitulé « Snapshots of archaeal DNA replication and repair in living cells using super-resolution imaging », il est paru en Septembre 2018 dans la revue *Nucleic Acid Research*.

Snapshots of archaeal DNA replication and repair in living cells using super-resolution imaging

Floriane Delpech[†], Yoann Collien[†], Pierre Mahou, Emmanuel Beaurepaire, Hannu Myllykallio^{*} and Roxane Lestini^{*}

Laboratoire d'Optique et Biosciences, Ecole Polytechnique, CNRS UMR7645 – INSERM U1182, 91128 Palaiseau Cedex, France

Received May 21, 2018; Revised September 03, 2018; Editorial Decision September 04, 2018; Accepted September 07, 2018

ABSTRACT

Using the haloarchaeon *Haloferax volcanii* as a model, we developed nascent DNA labeling and the functional GFP-labeled single-stranded binding protein RPA2 as novel tools to gain new insight into DNA replication and repair in live haloarchaeal cells. Our quantitative fluorescence microscopy data revealed that RPA2 forms distinct replication structures that dynamically responded to replication stress and DNA damaging agents. The number of the RPA2 foci per cell followed a probabilistic Poisson distribution, implying hitherto unnoticed stochastic cell-to-cell variation in haloarchaeal DNA replication and repair processes. The size range of haloarchaeal replication structures is very similar to those observed earlier in eukaryotic cells. The improved lateral resolution of 3D-SIM fluorescence microscopy allowed proposing that inhibition of DNA synthesis results in localized replication foci clustering and facilitated observation of RPA2 complexes brought about by chemical agents creating DNA double-strand breaks. Altogether our *in vivo* observations are compatible with earlier *in vitro* studies on archaeal single-stranded DNA binding proteins. Our work thus underlines the great potential of live cell imaging for unraveling the dynamic nature of transient molecular interactions that underpin fundamental molecular processes in the Third domain of life.

INTRODUCTION

In the three domains of life, DNA is replicated by dynamic multiprotein machines called replisomes that couple the activities of several proteins required for copying genetic information. To fully understand how this crucial and highly effi-

cient process occurs, information on the intracellular organization of the replisomes is required. The spatiotemporal localization and dynamics of intracellular replisomes have been extensively investigated in Bacteria and Eukarya using functional fluorescent derivatives of replisome components. These studies have revealed that DNA replication and synthesis of nascent DNA occur at discrete sites within the cell that can be localized through formation of stable fluorescent replication foci (RF). Obtaining analogous information on the organization of archaeal DNA replication in living cells would be of great interest from a mechanistic and evolutionary point of view, as archaeal chromosomes are circular and replicated either using single (1) or multiple (2) replication origins by a protein machinery resembling that of eukaryotes (3). The structure and length of short archaeal replication intermediates are also very similar to those of eukaryotic Okazaki fragments (4), further attesting to the close relationship between archaeal and eukaryotic DNA replication processes.

In Bacteria, fluorescent versions of several replisome components, including the replication clamp (DnaN) and the single-stranded DNA binding (SSB) proteins, have been used to localize and quantify replisomes in live cells. In *Bacillus subtilis* and *Caulobacter crescentus*, the replisome localization patterns indicated that the two sister replication forks form a stable focus and spatially co-localize throughout the replication cycle (5,6). By contrast, in *Escherichia coli*, each sister fork may act independently and replisomes move along the DNA template from the origin to the terminus (7–9). More recent imaging experiments combined with statistically robust image analyses have suggested that both in *E. coli* and *B. subtilis* two replication forks originating from a single replication origin co-localize up to 80% of the replication cycle, although occasional separation of sister forks is also possible (10).

Advanced optical microscopy techniques have been used to investigate the replisome localization and dynamics also in eukaryotes (11,12). These studies have underlined how

^{*}To whom correspondence should be addressed. Tel: +33169335010; Email: hannu.myllykallio@polytechnique.edu
Correspondence may also be addressed to Roxane Lestini. Tel: +33169335028; Email: roxane.lestini@polytechnique.edu
Present address: Molecular Biology of Archaea, Institute of Biology II, Faculty of Biology, Microbiology, University of Freiburg, Freiburg, Germany.
[†]The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as Joint First Authors.

technical developments in optical microscopy methods beyond the Abbe (diffraction) limit have changed our views on the intranuclear organization of DNA replication. In particular, improved lateral or axial resolution of stimulated emission depletion (STED) and 3D-structured illumination (3D-SIM) microscopy techniques was necessary to detect and quantify up to 6000 RF in the nucleus of human cells (13,14). Both super-resolution techniques revealed independently that the diameter of the eukaryotic RF varies between 40 and 210 nm with an average value of ≈ 150 nm. This size estimation was in close agreement with previous electron microscopy studies (15). The number of detected RF is fully consistent with the length of the S-phase and genome size of human and mouse cells (16). Several studies have suggested that these RF may reflect the association of neighboring replicons (17) and may correspond to replication domains that carry, on average, four co-replicating DNA regions of approximately 20 kb in length (18).

Studies on the intracellular localization of DNA synthesis in archaeal cells are scarce, as this topic has only been addressed in *Sulfolobus* species (19). In these species and possibly other Crenarcheota, the vast majority of the cells contained two to three peripherally located replication foci detected either by PCNA1 antibodies or click-labeling of alkyne (EdU) labeled nascent DNA. *Sulfolobus* chromosomes contain three replication origins *per* circular chromosome of ~ 3 Mb (2), suggesting that the observed foci may correspond to DNA replication structures directly or indirectly interacting with the cell membrane. This study also suggested that the sister replication forks established at specific origins remained in close vicinity (within the diffraction limit), while forks initiating from distinct further located origins remained spatially separated. More recently it was demonstrated that in *Sulfolobus* species, viral DNA synthesis also occurs near the periphery of the cell infected by a SIRV2 virus (20).

To gain new insight into DNA replication in living archaeal cells, we turned our attention to the salt-loving euryarchaeon *Haloferax volcanii*, as the mesophilic and aerobic lifestyle of this halophile facilitates the use of GFP fusions to study intracellular protein localization and dynamics (21). This species carries one main chromosome (3483 kb) with several replication origins and a high ploidy number (up to 30), as well as two smaller megaplasmids (22–24). The potential number of simultaneously active replication origins and/or replicons is thus very high for this prokaryotic species. Moreover, its chromatin architecture is similar to that of eukaryotes (25), as archaeal histone homodimers are capable of wrapping DNA with a periodicity of 70–80 nucleotides *in vivo* and *in vitro* (25,26). These characteristics clearly make *H. volcanii* a very interesting model for understanding the DNA replication of several replicons using fluorescence microscopy.

We successfully constructed an *H. volcanii* strain expressing from the native chromosomal locus the functional single-stranded DNA binding protein (RPA2) fused to Green Fluorescent Protein (GFP). Together with nascent DNA labeling, the obtained GFP::RPA2 fusion protein was an ideal proxy for haloarchaeal DNA replication and repair studies. Using wide-field and SIM super-resolution fluorescence microscopy coupled with quantitative image analysis,

we demonstrated that RPA2 forms distinct RF in proliferating cells that actively responded to replication stress and DNA damaging agents. The number of detected RF *per* individual cell was surprisingly low and demonstrated a significant cell-to-cell variation influenced by stochastic processes.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Unless stated otherwise, all chemicals used were purchased from Sigma-Aldrich.

Molecular biology techniques

Isolation of genomic and plasmid DNA and transformation of *H. volcanii* were carried out using published protocols (27–29). Standard molecular biology techniques were used for DNA isolation and manipulation. All PCR reactions were performed using Q5 polymerase from New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA) All other enzymes were purchased from Thermo Fisher Scientific (Villebon-sur-Yvette, France).

Strains, plasmids and growth conditions

Escherichia coli strains XL1-Blue MRF' ($\Delta mcrA183 \Delta mcrCB-hsdSMR-mrr173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac } [F' \text{ proAB lacI}^q \Delta M15 Tn10]$) and GM121 ($F^- \text{ dam}^-3 \text{ dcm}^-6 \text{ ara}^-14 \text{ fhuA31 galK2 galT22 hdsR3 lacY1 leu-6 thi-1 thr-1 tsx-78}$) were used for cloning. The latter $\text{dam}^- \text{dcm}^-$ strain was also used to prepare unmethylated plasmid DNA for efficient transformation of *H. volcanii*. *E. coli* transformants were selected on LB plates containing 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin, 0.5 mM IPTG and 80 $\mu\text{g/ml}$ X-Gal.

H. volcanii H26 strain ($\Delta \text{pyrE2 rpa2}^+$) was used during this work (28). *H. volcanii* cultures using enriched Hv-YPC or Hv-Ca media were grown at 45°C, as described previously (27). Hv-YPC contained (per liter) 144 g of NaCl, 21 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 18 g of $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 4.2 g of KCl, and 12 mM Tris-HCl (pH 7.5), Yeast extract (0.5%, wt/vol; Difco), 0.1% (wt/vol) peptone (Oxoid), and 0.1% (wt/vol) Casamino Acids (Difco). Casamino Acids medium (Hv-Ca) was similar to Hv-YPC except that yeast extract and peptone were omitted, and Casamino Acids were added to a final concentration of 0.5% (wt/vol). Different drugs were added after 2 hours of growth at 45°C to over-night cultures that were diluted to $\text{OD}_{600} \approx 0.1$, and incubation was continued for 18 h. Where indicated, different compounds were added to liquid cell cultures at the following concentrations: aphidicolin [2.5, 5, 10 or 20 $\mu\text{g/ml}$ dissolved in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO)] and phleomycin (12.5, 25, 50, 75 or 100 $\mu\text{g/ml}$). When aphidicolin stock solution was added to cells, only DMSO was added to control cells. To determine the fraction of surviving cells, cultures were diluted in 18% Salt Water (18% SW) containing 2.5 M NaCl, 90 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 90 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 60 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5. Aliquots of 20 μl were spotted on Hv-YPC plates and individual colonies were counted after 4 days incubation at 45°C.

Construction of *gfp::rpa2* strain

First, the fusion plasmid pFD2 carrying *gfp⁺::rpa2⁺* allele was constructed. Sequences of all oligonucleotides used during this work are indicated in the supplementary Supplementary Table S1. Three PCR products were amplified using genomic DNA from strain H26 (Δ *pyrE2*): (i) the upstream region of *rpa2* using primers RL129 and RL130, (ii) the *gfp* gene using primers RL85bis and RL124 on pRL29 plasmid DNA (21) and (iii) the first 400 bp of *rpa2* gene using primers RL131 and RL132. RL130 and RL131 both contain in their 5' extremity 18-based homology to the *gfp* PCR fragment (underlined in the Supplementary Table S1). Final PCR reaction was performed by mixing three PCR fragments (100 ng of each) and using RL129 and RL132 as primers. A PCR fragment containing US-*gfp⁺-rpa2⁺* was recovered and cloned into the pTA131 plasmid (*pyrE2⁺*). For this purpose, the pTA131 plasmid (27) was linearized by EcoRV digestion and the blunt extremities dephosphorylated by Antarctic Phosphatase. The US-*gfp⁺-rpa2⁺* fragment was phosphorylated using T4 polynucleotide kinase prior to ligation with pTA131 and transformation in *E. coli* XL-1 blue. The presence of the correct insert in the plasmid of white colonies was tested using colony PCR with primers BSF2 and BSR3. The sequence of one selected plasmid, pFD2, was further confirmed by sequencing on both strands. Then pFD2 was used to transform H26 strain (Δ *pyrE2*) using the pop-in/pop-out method as described previously (28). The presence of the *gfp* gene was tested by PCR on ten colonies from the pop-out plates using primers RL85bis and RL124. Two out of ten contained the *gfp* gene. Finally, the insertion of the *gfp⁺::rpa2⁺* allele at the locus was further confirmed by amplification of the locus using primers RL141 and RL165. A PCR product of 2996 bp length was obtained for the two *gfp⁺::rpa2⁺* clones, while a product of 2246 bp was obtained in the control performed on H26 DNA. Note that using an analogous approach we were unable to obtain constructs expressing chromosomally encoded GFP::PCNA or PCNA::GFP fusion proteins

Construction of Δ *hts* Δ *hdrB* strain

To generate the Δ *hts* Δ *hdrB* construct (because both genes are in an operon), the upstream region (US) of *hts* and the down-stream region (DS) of *hdrB* were cloned into pTA131 to generate the pRL55 plasmid used to construct the deletion strain by a gene knockout system (28). The US region was generated by PCR on H26 genomic DNA (Δ *pyrE2*) using primers RL208 and RL209. The DS region was generated by PCR on H26 genomic DNA using primers RL210 and RL211. Each PCR product contained 30 bp homology with adjacent fragments for sequence and ligation independent cloning (SLIC): (i) with the pTA131 linearized fragments after NotI and EcoRI double-digestion (contained in RL208), and with the DS fragment (contained in RL209) in the US fragment, and (ii) with the US fragment (contained in RL210), and with the pTA131 (27) linearized fragments after NotI and EcoRI double-digestion (contained in RL211) in the DS fragment. Following the SLIC method, PCR fragments and linearized plasmid were digested by T4 DNA polymerase exonuclease activity for 45 min at 22°C to

generate 3'-single-stranded extremities, then all amplification products were mixed in a 1:1:1 molecular ratio and incubated 30 min at 37°C prior to transformation into *E. coli* XL1-blue. The presence of the correct inserts was tested by PCR amplification on white colonies using primers pBSF2 and pBSR3. The sequence of one selected plasmid, pRL55, was further confirmed by sequencing on both strands. Then pRL55 was used to transform strain H26 (Δ *pyrE2*) using the pop-in/pop-out method as described previously. Pop-out colonies were plated on Hv-Ca plates containing 5-FOA and thymidine. The absence of the *hts* and *hdrB* genes was tested by colony lift on 100 colonies from the pop-out plates using a probe targeting *hdrB*. The digoxigenin (DIG)-labeled probe was generated by PCR on H26 genomic DNA using primers RL52 and RL53 and the PCR DIG labeling Mix from Roche. Probe hybridization was detected using the DIG Luminescent Detection kit (Roche) and a Chemi-Doc MP (BioRad). Thirty three colonies out of one hundred were deleted for *hts* *hdrB* genes. Thymidine auxotrophy was confirmed by plating Δ *hts* Δ *hdrB* constructs on both YPC plates and YPC plates containing 165 μ M thymidine: colonies could be observed only on YPC plates containing thymidine. One Δ *hts* Δ *hdrB* constructed was conserved for further studies, and designated HvYC0.

UV irradiation and post-UV recovery assays

For UV (254 nm) irradiation assays on plated cells, cultures were grown to $\approx 10^8$ cells/ml, diluted in 18% SW and 20 μ l aliquots spotted on YPC plates. Once spots were dried, cells were exposed to UV radiation and incubated at 45°C for 4–5 days in the dark for determining the number of survivors. For post-UV recovery assays using cells in liquid media, exponentially growing cells (OD \sim 0.1) were centrifuged and resuspended in an equal volume of 18% SW. Aliquots were exposed to 50 or 100 J/m² or were not irradiated (control). Cells were centrifuged again, resuspended in an equal volume of Hv-YPC broth and grown in the dark at 45°C with agitation prior to imaging.

Monitoring nascent DNA labeling in Δ *hts* Δ *hdrB* strain

Precultures of *H. volcanii* Δ *hts* Δ *hdrB* (HvYC0) were performed in YPC medium containing 165 μ M thymidine. Cells were washed by centrifugation at 4000 rpm for 10 min followed by resuspension of cells to reach OD \approx 0.1 in fresh YPC medium supplemented with 50 or 100 μ M BrdU or 165 μ M thymidine. Cell growth was monitored by measuring the OD at 600 nm (Supplementary Figure S1A). BrdU incorporation into DNA was investigated by genomic DNA extraction and dot blot experiments. Genomic DNA (gDNA) was extracted using the Nucleospin Tissue kit from Macherey-Nagel. For each sample, 200 ng of gDNA was spotted on a Nylon membrane Hybond-N (Amersham). gDNA was denatured by incubation in denaturing solution [1.5 M NaCl; 0.5 M NaOH] for 5 min and neutralized by incubation in neutralization solution [1.5 M NaCl; 0.5M Tris-HCl pH 7.5; 1 mM EDTA] for 3 min twice. Then DNA was cross-linked by UV exposure to 0.120 J/cm² (1200 J/m²) using a BIO-LINK cross-linker (Vilbert Lourmat, Collégien, France). BrdU detection was

performed using a 1/200 dilution of Alexa488-labelled anti-BrdU antibody (Milli-Mark, Darmstadt, Germany) following manufacturer's recommendations. Fluorescence signal was detected using the ChemiDoc MP (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). A representative dot blot and its quantification are shown in Supplementary Figure S1B and C, respectively.

Wide-field fluorescence microscopy of GFP fusion proteins

Cells were mounted on glass slides covered with a thin layer of 1% agarose prepared in 18% SW. Differential interference contrast (DIC, also known as Nomarski interference contrast) and fluorescence images were obtained at room temperature using a ZEISS (Leipzig, Germany) Axio Observer equipped with a 40 \times , 1.4 NA oil immersion objective. For fluorescence imaging of GFP, 470 nm excitation at a maximum available intensity (5 W cm⁻²) and filter set 65 HE (EX BP 475/30, BS FT 495, EM BP550/100) were used. For each experiment, at least three different z -stacks of 30 slices centered on DIC focus ($\Delta z = 0.250 \mu\text{m}$) were acquired. For each z -stack, we extracted a 2D projection of the maximum intensity using Fiji software (30). Quantitative image analyses were performed on the 2D projections using Fiji. First, cells were segmented by adjusting Otsu's threshold manually. The following items were automatically excluded: (i) objects on the border of the image 'Outlines display exclude' and (ii) objects consisting of less than 40 pixels. Then, the GFP signal from the 2D projection was measured in each cell [region of interest (ROI)] to obtain the area of the cell (μm^2), and the mean, minimum as well as maximum intensities in arbitrary units (A.U.). The identification of foci was achieved by identifying maxima using the 'find maxima' function that determines the local maxima in each cell (ROI) of the image. For these experiments, a noise tolerance of 35 was used, resulting in an output with foci counts in each cell (ROI). For each experiment, at least three z -stacks were acquired and results corresponding to the average of three independent biological replicates were obtained. Unpaired t -tests with Welch's correction were performed using GraphPad Prism 5 software. Where indicated, discrete distributions of the foci number were fitted using a Poisson function implemented in the Origin 8 software package using the average of the distribution as the only fitting parameter.

Localization of nascent BrdU-labeled DNA in $\Delta hts \Delta hdrB$ cells

Precultures of *H. volcanii* $\Delta hts \Delta hdrB$ (HvYC0) were performed in YPC medium containing 165 μM thymidine. Cells were washed by centrifugation at 4000 rpm for 10 min followed by resuspension of cells to reach OD = 0.25 in fresh YPC medium supplemented with 100 μM BrdU. Cells were grown at 45°C and aliquots were analyzed at various time points. Samples were centrifuged 10 min at 4000 rpm, cell pellets were resuspended in 5 ml 18% SW, where 10 mM Tris-HCl pH 7.5 was replaced by 10 mM HEPES pH 7.5 (HEPES-18SW) containing 4% formaldehyde and incubated 2 h at RT with smooth agitation. Then, fixed cells were washed and resuspended using 60% ethanol containing 3% SW. Cells were washed twice in 18% SW and

incubated for one hour at 45°C in a solution containing 35% formamide; 13.5% SW, followed by three washes using phosphate buffered saline (PBS). Immunodetection of BrdU was performed by incubating the cells with anti-BrdU primary antibody coupled with Alexa 488, using a 1/100 dilution (Milli-Mark, ref. 740952), for one hour (Supplementary Figure S1). Cells were washed three times in PBS and resuspended in 18% SW for imaging. Cells were imaged as previously described and the Alexa 488 signal was detected and analyzed using the parameters applied for GFP.

Wide-field microscopy to study DNA localization and compaction

For DNA labeling by a fluorescent Hoechst 33258 dye (excitation 352 nm/emission 461 nm), cells were centrifuged and resuspended in an equal volume of 18% SW containing 5 $\mu\text{g/ml}$ of Hoechst 33258. After 10 min incubation at room temperature in the dark, cells were centrifuged and resuspended in an equal volume of 18% SW. Cells were mounted on glass slides covered with a thin layer of 1% agarose in 18% SW. DIC and fluorescence images were obtained at room temperature using a ZEISS Axio Observer microscope equipped with a 40 \times , 1.4 NA oil immersion objective. For fluorescence imaging of the GFP signal, 470 nm excitation at a maximum available intensity (5 W cm⁻²) and filter set 65 HE (EX BP 475/30, BS FT 495, EM BP550/100) were used, whereas 365 nm excitation at a maximum available intensity (2 W cm⁻²) and filter set 49 (EX G 365, BS FT 395, EM BP 445/50) were used for fluorescence imaging of the Hoechst signal. A z -stack (30 slices) centered on DIC focus was performed and data was collected sequentially for Hoechst and GFP signals at each plane. The optical slice with the maximum number of GFP foci was chosen for further study and the Hoechst fluorescence signal was analyzed to determine the mean, minimum and maximum intensities in A.U.

3D-Structured Illumination microscopy (3D-SIM)

Cells were mounted on glass slides covered with a thin layer of 1% agarose prepared in 18% SW. Images were acquired on a Delta Vision OMX SR imaging system (OMX version 4.3.9379-1) from GE Healthcare (Velizy, France) with an Olympus PlanApo N 60 \times 1.42 NA oil immersion objective, using the Cargille labs immersion oil providing an n_D (at 25°C and 589.3 nm) = 1.5140 ± 0.0002 to minimize spherical aberrations. Imaging was performed using excitation at 488 nm during 25 ms at 40%T (13.2 mW). For each cell, images of 256 \times 256 pixels (pixel size of 80 nm) were acquired with a sample thickness of 1 μm (9 sections, $\Delta z = 125$ nm) centered on the focus point. At each z position, SI images (five phases at three angles) were acquired for 3D-SIM imaging. The quality of the raw SI data was checked by the *SIMcheck* suite of plugins available for Fiji software prior to SI reconstruction performed with the softWoRx software from Applied Precision (Supplementary Figure S2). To highlight the resolution improvement gained using 3D-SIM, an image equivalent to conventional wide-field illumination was generated from raw SI images using the raw SI data to pseudo-wide-field (PWF) utility of the *SIMcheck*

plugin. PWF images were obtained, and quantitative image analyses were performed on both SI and PWF images as described previously: ROI corresponding to cells are defined by manually adjusting Otsu's threshold, and the identification of foci was achieved by identifying maxima with a noise tolerance of 400 and an output style of foci counts in each ROI (cell). The surface area of more than one hundred automatically detected RF were measured by manually limiting their edges. From the obtained area (A), the diameter (D) of the analyzed foci was calculated using the formula: $D = 2\sqrt{A/\pi}$.

FRAP experiments

The samples were prepared as described for 3D-SIM imaging, and FRAP experiments were also performed on the DeltaVision OMX SR imaging system from GE Healthcare previously described. A spot size of approximately 250 nm was selected and bleached using the 405 nm channel with a 3%T (0.66 mW) excitation for a total bleach duration of 50 ms. In total, 101 wide-field images were collected including ten pre-bleach frames at 500 ms/frame for a total acquisition time of 50 s. Background intensity trace $I_b(t)$ was obtained from an ROI outside the cell, and the bleaching of the sample during the experiment $I_{sb}(t)$ was obtained from an ROI inside the cell excluding the photobleached region. The raw fluorescence intensity of the bleached area $I(t)$ was normalized using $I_n(t) = [I(t) - I_b(t)]/I_{sb}(t)$. A mono-exponential function was used to fit each normalized trace from different experiments (11 for control cells, 20 for APD-treated cells and 14 for phleomycin-treated cells) using the following formula

$$A - B \times \exp(-k \times t)$$

where A , B and k are fitting parameters. A and B are related to the mobile and immobile fractions of fluorophores: *immobile fraction* = $1 - a$ and *mobile fraction* = b . k (s^{-1}) is the recovery rate of the bleached area which was directly converted into the recovery half-time $\tau_{1/2}$ (s) calculated as $\tau_{1/2} = \ln(2)/k$. Unpaired t -tests with Welch's correction were performed using GraphPad Prism 5 software.

RESULTS

H. volcanii RPA2 protein as a proxy for haloarchaeal DNA replication and repair

As a first approach to label *H. volcanii* replication and repair complexes in living cells, we considered the use of GFP-PCNA fusions as replisome markers. However, as stated in the material and methods section, we were unable to replace the chromosomal PCNA gene with the DNA constructs carrying GFP either at the amino- or carboxy-terminal regions of PCNA (HVO_0175), possibly due to steric hindrance of interactions of the replication clamp with other essential replication proteins. Consequently, we decided to create GFP fusions with halophilic single-stranded DNA binding proteins. *H. volcanii* encodes three RPA homologs, named RPA1 (HVO_1338), RPA2 (HVO_0519), and RPA3 (HVO_0292) (31,32). Note that these same proteins are also referred to as RpaA, RpaC, and RpaB, respectively (33).

Previous genetic studies revealed that cells lacking RPA1 (and its associated proteins) or RPA3 (and its associated protein) are viable, but that obtaining a double mutant lacking both RPA1 and RPA3 genes was not possible (32,33), strongly suggesting that RPA1 and RPA3 share an essential function. By contrast, RPA2 was found to be essential for viability, as *H. volcanii* cells deleted for a *rpa2* gene cannot be isolated and the down-regulation of *rpa2* expression under the control of a tryptophan-inducible promoter leads to little or no growth in the absence of tryptophan. Moreover, RPA2 overexpression enhances resistance to DNA-damaging agents (33). These observations indicate that RPA2 plays a key role in DNA replication and repair in this halophilic archaeon and justify the use of the *H. volcanii* RPA2 protein as a proxy for archaeal DNA replication and repair.

Functional expression of the GFP-labeled RPA2 protein in *Haloferax volcanii* cells

To investigate the *in vivo* localization of DNA replication and repair complexes in *H. volcanii*, we engineered a strain expressing GFP fused to the amino terminus of RPA2 (HVO_0519) from the native chromosomal locus. We first constructed the plasmid pFD2 that carries the upstream region of *rpa2*, the *gfp* gene encoding the smRS-GFP variant that has been successfully used in *H. volcanii* cells (21,34), and the first 400 bp of the *rpa2* gene. The resulting construct carrying an in-frame fusion of *gfp* and *rpa2* was integrated at the *rpa2* chromosomal locus of *H. volcanii* H26 using the pop-in/pop-out method (Figure 1A). All colonies resulting from excision of the plasmid from the chromosome (pop-out) showed comparable growth characteristics on solid media. In 20% (2 out of 10) of the clones tested, the *gfp⁺::rpa2⁺* fusion was inserted at the chromosomal *rpa2* locus allowing expression of a GFP-labeled RPA2 protein from its native promoter. One representative clone carrying a chromosomal *gfp⁺::rpa2⁺* (HvFD1) was selected for further study. The generation time of the *gfp⁺::rpa2⁺* strain was not significantly different from the *rpa2⁺* H26 cells [$2.2h \pm 0.4$ and $1.9h \pm 0.4$ respectively (Supplementary Table S2)], establishing that the GFP:RPA2 fusion complements essential functions of RPA2. To further confirm the functionality of this fusion protein, HvFD1 (*gfp⁺::rpa2⁺*) cells were exposed to DNA damaging agents. The survival of *gfp⁺::rpa2⁺* cells challenged with UV radiation (Figure 1B) was similar to the control cells up to $100 J/m^2$, whereas at $150 J/m^2$ cells carrying a wild type *rpa2* survived better (one log difference). The survival of the *gfp⁺::rpa2⁺* strain in the presence of the DNA-cleaving agent phleomycin appeared ~ 5 -fold less when compared with *rpa2⁺* cells (Figure 1C), but this difference was close to the observed standard deviations of individual data points. Finally, *gfp⁺::rpa2⁺* cells were also exposed to aphidicolin, which blocks DNA synthesis in halophilic archaea (35). Surprisingly, *gfp⁺::rpa2⁺* cells exposed to increasing doses of aphidicolin were apparently less affected than *rpa2⁺* cells (Figure 1D). Using Western blot analyses, we did not observe major modulation in a steady-state expression level of the studied GFP fusion protein under the different conditions tested (Supplementary Figure S3). Taken together, these results indicate that

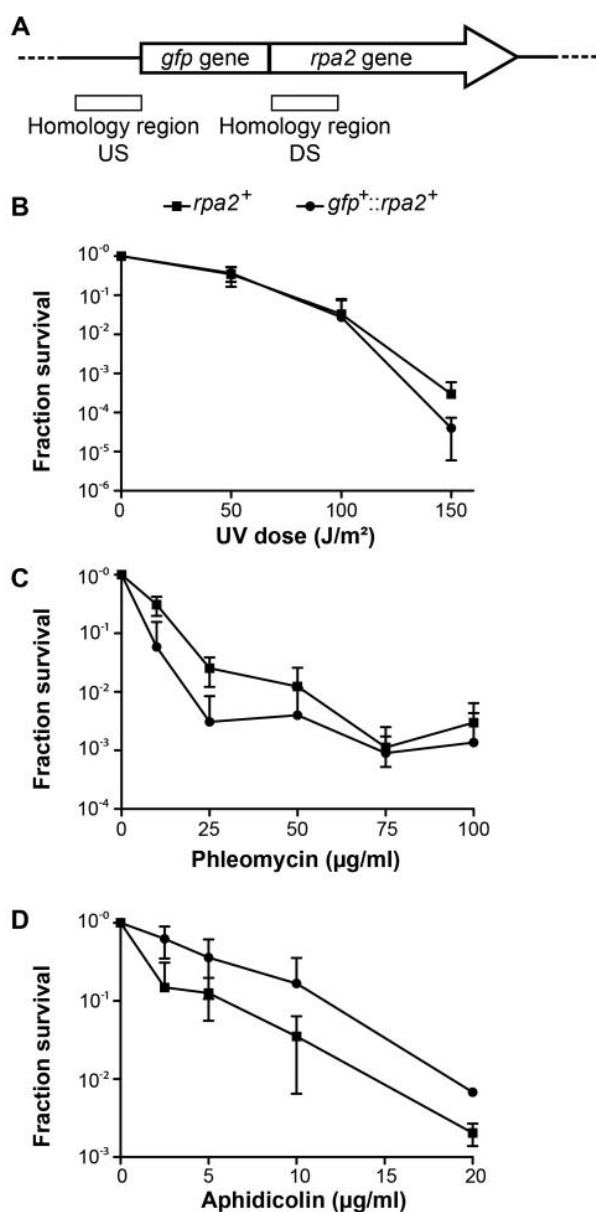


Figure 1. *gfp*-fused *rpa2* allele construction and functional characterization. (A) Representation of the chromosomal locus of the *gfp*⁺::*rpa2*⁺ allele. The regions of homology between the plasmid and the chromosome used for pop-in/pop-out gene replacement are represented by white boxes [Up-Stream (US) and Down-Stream (DS) regions]. Surviving fractions for *rpa2*⁺ (■) and *gfp*⁺::*rpa2*⁺ cells (●) in response to (B) increasing doses of UV irradiation, (C) increasing concentrations of phleomycin and (D) increasing concentrations of aphidicolin. Error bars represent standard deviations of at least three independent experiments.

the GFP::RPA2 fusion protein fulfills the essential role(s) of RPA2 not only in DNA replication, but also may actively respond to DNA damaging agents and replication inhibitors.

GFP::RPA2 forms fluorescence foci in exponentially growing *Haloferax volcanii* cells

We studied the cellular localization of the functional GFP-tagged RPA2 protein in living *H. volcanii* cells under opti-

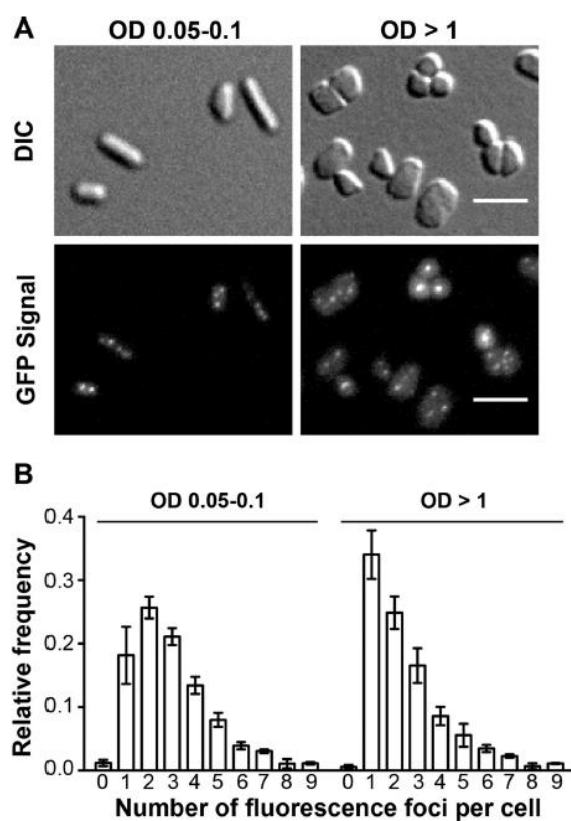


Figure 2. *In vivo* localization of GFP-labeled RPA2 under normal growth condition. A total of 391 cells at OD 0.05–0.1 and 1597 cells at OD >1 were analyzed. (A) Images of DIC and GFP signal of *gfp*⁺::*rpa2*⁺ cells at OD 0.05–0.1 and at OD >1 are indicated. A scale bar equals 5 μm. (B) Relative frequency of number of foci per individual cell is shown. Error bars represent standard deviations of at least three independent experiments.

mal growth conditions using enriched growth medium. For these experiments, *gfp*⁺::*rpa2*⁺ cells were placed on a thin agarose slice, covered with a glass coverslip and subjected to wide-field imaging with an Axio Observer ZEISS microscope using a 40×, 1.4 NA, oil objective (0.26 μm resolution). In exponentially growing *gfp*⁺::*rpa2*⁺ cells [optical densities (OD) ranging from 0.05 to 0.1], we observed well-defined RF (Figure 2A), whereas we observed only a very diffuse fluorescence signal in cells expressing non-fused GFP (21). The average number of fluorescence foci measured in exponentially growing *gfp*⁺::*rpa2*⁺ cells was 3.3 ± 0.6 foci (391 cells analyzed). These GFP::RPA2 foci were also observed in cells reaching stationary phase (OD ≥ 1), but their average number of 2.8 ± 0.3 (1597 cells analyzed) was slightly decreased in comparison to exponentially growing cells (Figures 2A and B). In both cases, the number of RF followed closely a Poisson distribution between one and nine RF, with the fitted average value of 2.76 ± 0.12 (exponentially growing cells) and 2.10 ± 0.20 (stationary phase cells), as shown in Supplementary Figure S4A and B. On the other hand, the number of cells (<2%) with no detectable RF was much less than expected from a Poisson distribution (Supplementary Figure S4). These results thus indicate that rapidly proliferating cells have a slightly increased num-

ber of RF when compared to stationary phase cells and revealed significant cell-to-cell variation following a Poisson distribution.

As the RPA2 foci were observed in exponentially growing cultures in the absence of exogenous DNA damaging agents, by analogy to earlier studies, these foci may reflect the *in vivo* localization of active DNA replication forks. However, we do not exclude the possibilities that RPA2 may also associate with spontaneously stalled or collapsed replication forks and/or chromosomal regions undergoing DNA repair in response to spontaneous DNA damage.

Nascent DNA labeling reveals distinct replication foci in fixed *H. volcanii* cells

To investigate the intracellular localization of nascent DNA synthesis in *H. volcanii*, we engineered a thymidine auxotrophic strain by deleting both *hts* and *hdrB* genes encoding thymidylate synthase and dihydrofolate reductase, respectively. Both genes are involved in thymidylate synthesis (36) and form an operon on the *H. volcanii* chromosome, facilitating their simultaneous deletion by the pop-in/pop-out method (37). The resulting $\Delta hts \Delta hdrB$ strain was auxotrophic for thymidine and could not grow on solid or liquid YPC media in the absence of thymidine. By growing cells in YPC media containing 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), we could show that $\Delta hts \Delta hdrB$ cells incorporate thymidine analogs into nascent DNA more efficiently than wild-type cells (Supplementary Figure S1). The intracellular localization of nascent DNA was investigated by immunolocalization of BrdU-labeled DNA using Alexa 488-labeled anti-bromodeoxyuridine antibodies after cell fixation, permeabilization of cell membranes and DNA denaturation. Discrete fluorescence foci were detected in exponentially growing cells after 30 min incubation in the presence of BrdU. Their average number *per* cell increased from 1.3 ± 0.1 (60 min of BrdU labeling) to 2.3 ± 0.6 (180 min) (Figure 3A and B). Under these conditions, the vast majority of cells contained one to five nascent DNA foci (>90%), whereas <10% of the cells were not undergoing replication at all, as witnessed by the small number of cells without detectable BrdU foci (Figure 3C). These results thus indicate that in non-synchronized exponentially growing cultures the vast majority of the individual *H. volcanii* cells are engaged in DNA synthesis, as suggested by formation of RF as described above.

UV irradiation decreases GFP::RPA2 foci number

H. volcanii RPA2 is involved in repair of DNA damage triggered by UV irradiation (33), prompting us to investigate GFP::RPA2 intracellular localization in cells treated with UV. Irradiation of exponentially growing cells was performed in liquid medium, followed by a recovery period and imaging. As this recovery phase took place in the dark, DNA repair of UV damaged DNA was dependent on the Nucleotide Excision Repair (NER) pathway. Using liquid cultures, a 10-fold decrease in cell survival was observed upon irradiation of cells with 50 and 100 J/m² compared to plated cells (Figures 4A and B). Because UV irradiation was performed on plated cells having reached stationary

phase (OD > 1.0), these results may reflect a higher sensitivity of exponentially growing cells to UV irradiation. In both control cells and cells exposed to 50 J/m² (Figures 4C and D), the average number of GFP::RPA2 fluorescence foci remained constant throughout the experiment and the number of GFP::RPA2 foci in cells treated with 50 J/m² UV irradiation was similar to that observed in UV-treated stationary phase cells. The numbers of RF in the different UV-treated samples were also Poisson distributed with average values of 3.87 ± 0.15 (non-irradiated cultures), 2.50 ± 0.20 (50 J/m²) and 1.50 ± 0.40 (100 J/m²), as shown in Supplementary Figure S4C. In cells exposed to higher UV doses that decreased cell survival, the average number of GFP::RPA2 foci dropped significantly during the first two hours and then remained stable for 2 h (Figure 4B), indicating that maximum effect of UV irradiation was observed. Under these conditions, the cells with a single focus represented only $5 \pm 4\%$ (no UV) in control cells, but their number increased in a dose-dependent manner. The UV-induced single focus was relatively large, particularly in cells treated with 100 J/m², as illustrated in Figures 4A and D. Overall, these results suggested that GFP::RPA2 foci dynamically respond to UV-induced DNA damage, frequently resulting in the formation of a single large focus at high doses of UV radiation.

Replication stress and DNA breaks result in formation of distinct RPA2 complexes

Next, we investigated the effect of the DNA synthesis inhibitor aphidicolin on the intracellular localization of GFP::RPA2 fluorescence foci. Using diffraction limited microscopy, exposure to 5 μ g/ml of aphidicolin significantly increased the average number of GFP::RPA2 fluorescence foci from 2.8 ± 0.3 (in the absence of the drug) to 4.9 ± 1.0 foci *per* cell with a concomitant increase in cell size (Figures 5A and B), in agreement with our earlier observations (21). We also used the super-resolution 3D-SIM (Structured Illumination Microscopy) technique (38), which improves the lateral resolution to ≈ 100 nm, to study aphidicolin treated cells. Our 3D-SIM experiments indicated that aphidicolin markedly increased the foci number when compared to untreated cells (Figure 5C and D). Owing to the improved lateral resolution, 3D-SIM revealed a subset of closely located individual foci in SI reconstructed images that were not fully resolved in wide-field or pseudo wide-field images.

We also exposed *H. volcanii* cells to phleomycin, which creates double-strand and/or single-strand breaks with poorly defined DNA extremities in this species (39). In the majority of phleomycin-treated cells (100 μ g/ml), using diffraction-limited microscopy, we observed a single fluorescence focus that appeared significantly larger than the RF observed in untreated or aphidicolin-treated cells (Figure 5A). The use of 3D-SIM microscopy, however, clearly revealed multiple discrete fluorescence foci (Figures 5B and D). Foci quantification using 3D-SIM images revealed that phleomycin increased the average number of GFP::RPA2 fluorescence foci and also changed the intracellular localization of RPA2 fusion proteins, when compared to untreated cells (Figure 5).

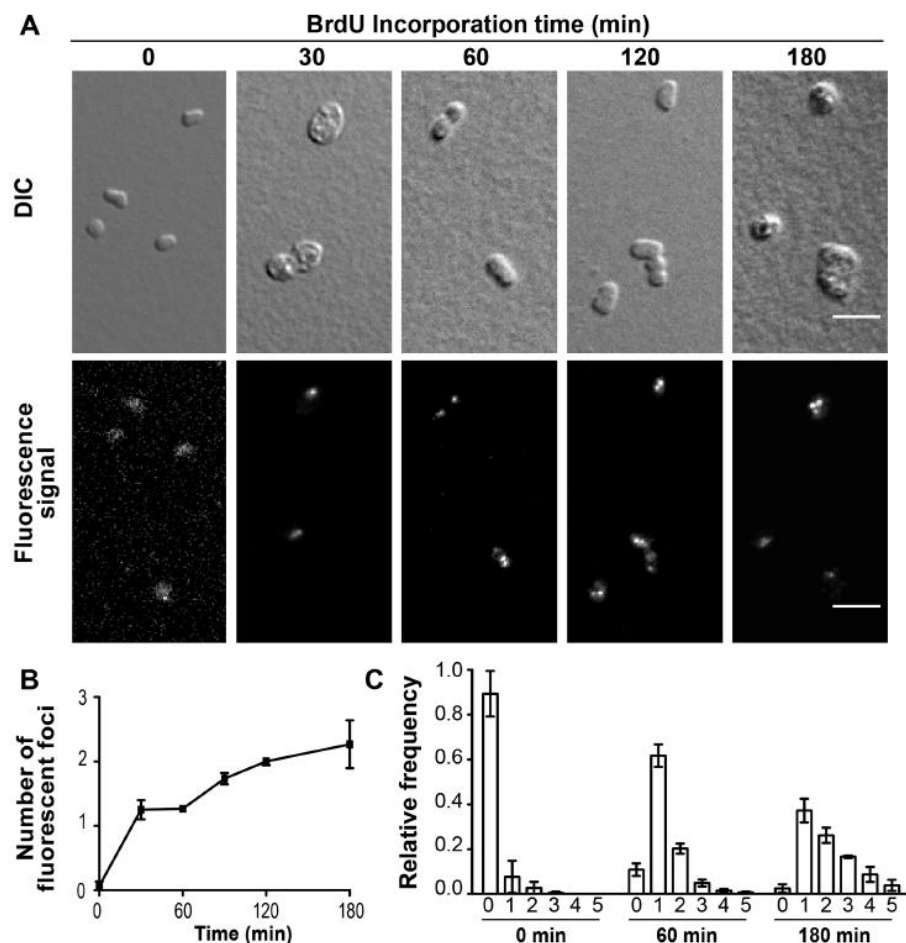


Figure 3. Intracellular localization of nascent DNA. A total number of 163 cells were analyzed at the starting time point of BrdU incorporation, 139 after 30 min, 281 after 60 min, 951 after 120 min and 260 after 180 min. (A) DIC images and Alexa 488 signal of anti-BrdU antibody of $\Delta hts \Delta hdrB$ cells grown in rich media containing 100 μM BrdU. A scale bar equals 5 μm . (B) Mean number of nascent DNA foci formed observed using BrdU labeling and immunodetection of fixed cells. (C) Relative frequency of number of nascent DNA foci per individual cell. Error bars represent standard deviations of at least three independent experiments.

We further exploited our 3D-SIM data by estimating the diameter of the observed RPA2 foci. First, the surface areas of more than one hundred RF corresponding to the different experimental conditions were determined as described in the Materials and Methods section. The obtained mean surface areas \pm standard deviation for DMSO (control), aphidicolin and phleomycin treated cells were 0.073 ± 0.041 ($n = 116$), 0.086 ± 0.046 ($n = 112$) and $0.0399 \pm 0.023 \mu\text{m}^2$ ($n = 137$), respectively, which typically represented far $<1\%$ of the total cell surface area (Figure 5C). By approximating these surface areas as circular foci, we obtained a cumulative distribution for the diameter of each studied object (Figure 5F). The estimated values ranged from 50 to 300 nm, indicating considerable heterogeneity in the architecture of the detected RPA2 complexes. The mean values of the determined size estimates were approximately 150 nm for control [95% confidence interval (95% CI): 139–154 nm] and aphidicolin (95% CI: 153–168 nm) treated cells. However, the foci brought about by phleomycin treatment appeared systematically smaller with an estimated mean diameter of 108 nm (95% CI: 103–113 nm).

These results indicate that the different conditions and treatments used here may result in the formation of varying amounts of exposed ssDNA bound by different numbers of RPA2 molecules in live *H. volcanii* cells.

Phleomycin-triggered formation of RPA2 foci coincides with DNA compaction

DNA damaging agents induce DNA compaction in a dose-dependent manner in *H. volcanii* (40). Thus, we quantitatively investigated DNA compaction of cells exposed to 5 $\mu\text{g/ml}$ aphidicolin or 100 $\mu\text{g/ml}$ phleomycin by wide-field fluorescence microscopy using a fluorescent DNA binding dye. For each observed cell, the DNA labeling signal (DNA compaction) was determined at the same focal plane where most of the GFP::RPA2 foci were observed. In the majority of control cells and cells exposed to aphidicolin, a rather diffuse cytosolic DNA signal was observed, as shown in Figure 6A. In contrast, in the majority of the phleomycin-treated cells, the DNA signal appeared much brighter and significantly more condensed. We performed quantitative

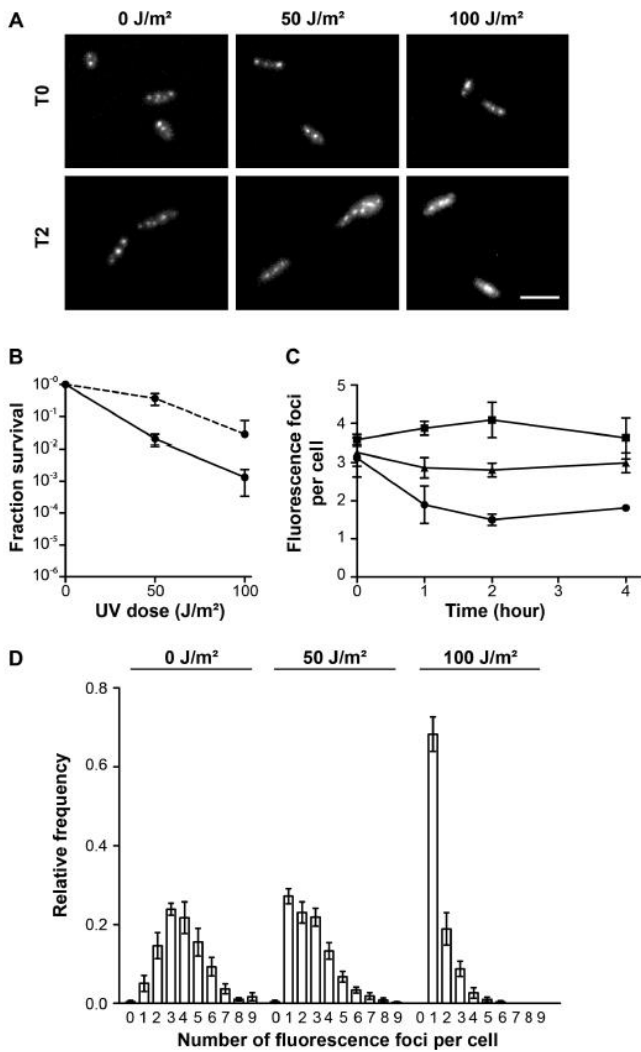


Figure 4. *In vivo* localization of GFP-labeled RPA2 after UV irradiation. A total of 391 cells at OD 0.05–0.1 and 1597 cells at OD >1 were analyzed. (A) Images of GFP signal of *gfp⁺::rpa2⁺* cells unirradiated (0 J/m²) or after 50 and 100 J/m² UV irradiation, without recovery (T0) and after two hours recovery (T2). A scale bar is equal to 5 μm. (B) Surviving fractions of *gfp⁺::rpa2⁺* cells in response to increasing doses of UV irradiation performed on plated cells (dotted line, as in Figure 1B) and in liquid cultures (continuous line). (C) The average number of fluorescence foci per cell as a function of time in unirradiated cells (■) and after 50 (▲) and 100 J/m² (●) UV irradiation. (D) Relative frequency of number of foci per individual cell after 2 h recovery. Error bars represent standard deviations of at least three independent experiments.

analyses of the DNA signal in the cells containing one to four GFP::RPA2 foci, as they represent the majority of cells. Although the mean intensity of the DNA signal was similar in all cells (Figure 6B), the maximum localized intensity measured in phleomycin-treated cells was significantly higher compared to untreated cells or cells exposed to aphidicolin (Figure 6C). These results revealed that the DNA content of the cells does not significantly fluctuate between the different experiments, but that the addition of phleomycin triggers DNA compaction and formation of the ‘small’ RPA2 foci described above. It should also be

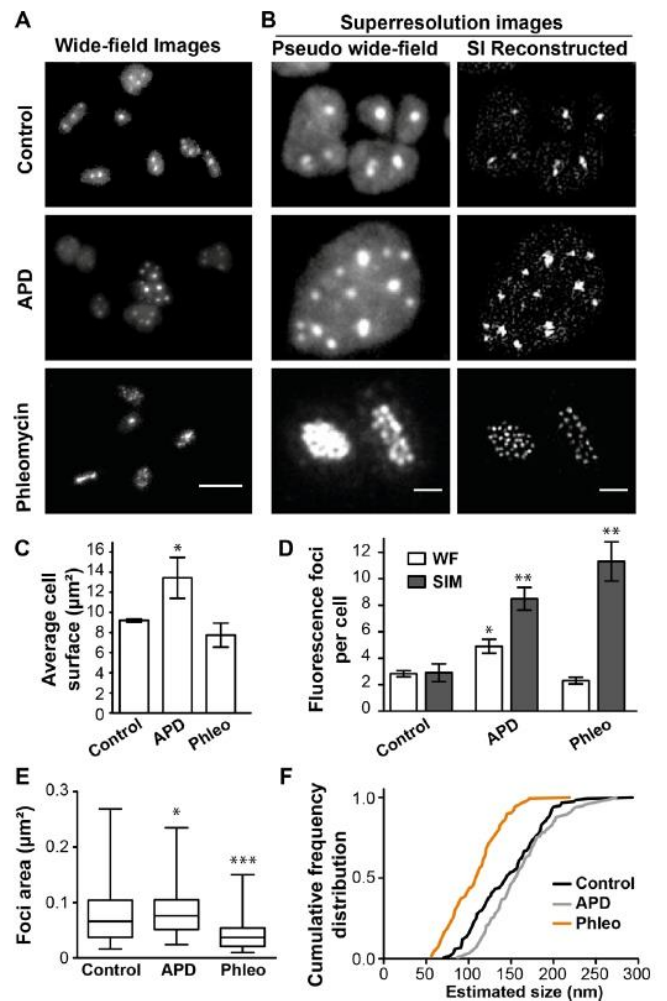


Figure 5. *In vivo* localization of GFP-labeled RPA2 using SIM microscopy. A total of 144 control cells, 75 cells exposed to 5 μg/ml aphidicolin, and 116 cells exposed to 100 μg/ml phleomycin, were analyzed. (A) Images of GFP signal of *gfp⁺::rpa2⁺* cells using wide-field microscopy. Bar equals 5 μm. (B) Images for each condition of GFP signal of *gfp⁺::rpa2⁺* cells using SIM microscopy, comparing pseudo-wide field (PWF) image with the image obtained after SIM reconstruction. Bar equals 1 μm. (C) Average cell surface. (D) Mean number of GFP-RPA2 labeled fluorescence foci obtained when analyzing PWF images (light histograms) and SIM images (grey histograms). (E) Foci area measured on images after SIM reconstruction. A total of 116 foci were analyzed for control cells, 112 for cells exposed to aphidicolin and 140 for cells exposed to phleomycin. (F) Cumulative frequency distribution of the foci size estimates approximated as circles. Error bars represent standard deviations of at least three independent experiments. Unpaired *t*-test with Welch’s correction were performed in comparison to control cells. ***Significantly different, *P* < 0.001; **Significantly different, *P* < 0.01; *Significantly different, *P* < 0.05.

noted that in phleomycin-treated cells, RPA2 co-localized with compacted DNA (Figure 6A).

Diffusion dynamics of GFP::RPA2 proteins is constant upon DNA damage or replication stress

To characterize an average mobility of GFP::RPA2 molecules at the foci, we performed fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) measurements. For each

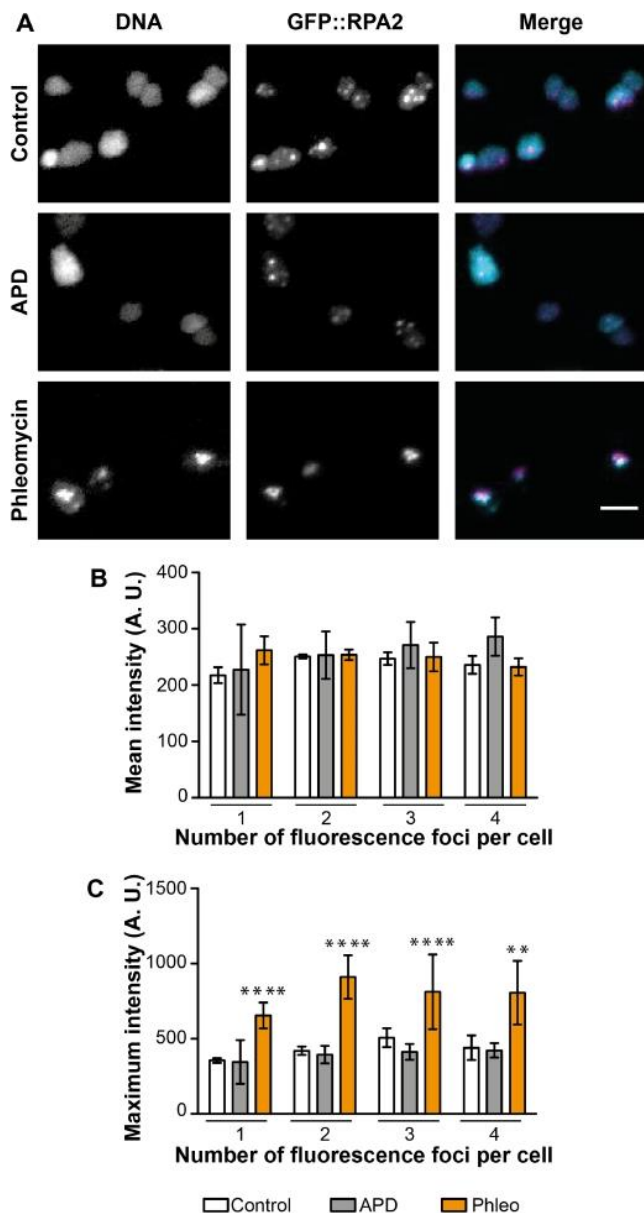


Figure 6. *In vivo* localization of Hoechst-labeled DNA and GFP-labeled RPA2 using wide-field microscopy. A total of 274 control cells, 159 cells exposed to 5 $\mu\text{g/ml}$ aphidicolin, and 389 cells exposed to 100 $\mu\text{g/ml}$ phleomycin, were analyzed. (A) Images for each condition of the Hoechst-labeled DNA, the GFP signal and the merge image of the DNA signal in cyan and the GFP signal in magenta. Bar equals 5 μm . (B) Mean intensity (A.U.) and (C) Maximum intensity (A.U.) of the Hoechst-labeled DNA signal in cells depending on the individual number of GFP::RPA2 foci. Light histograms correspond to control cells, grey ones to aphidicolin-treated cells and orange ones to phleomycin-treated cells. Error bars represent standard deviations of at least three independent experiments. Unpaired *t*-test with Welch's correction were performed in comparison to control cells. ****Significantly different, $P < 0.0001$; **Significantly different, $P < 0.01$.

analyzed cell, a region including one GFP::RPA2 focus was photobleached and fluorescence recovery kinetics were measured using cells exposed to DMSO (control), aphidicolin or phleomycin (Figure 7A). Our results suggested that $\approx 80\%$ of the fluorescence was recovered within twenty seconds in control and drug-treated samples (Figure 7B). In all cases, a mono-exponential fit of recovery curves reflected the existence of one major population of diffusing GFP::RPA2 molecules (Figure 7A). The average recovery half-times, calculated from the fitted curves (Figure 7C), were similar for control cells (8.40 ± 2.6 s) and cells exposed to aphidicolin (10.3 ± 5.2 s) or phleomycin (10.1 ± 3.7 s). These results thus indicate that up to 80% of GFP::RPA2 molecules forming foci are mobile, whereas $\sim 20\%$ of RPA2 molecules may remain bound to or associated with DNA during the investigated time span.

DISCUSSION

We have developed a fluorescent variant of the single-stranded DNA binding protein RPA2 (32,33) and nascent DNA labeling as new tools to study DNA replication and repair in live haloarchaeal cells.

Three RPAs are found in the *H. volcanii* genome (31). We focused on RPA2 as genetic studies had shown that it is essential for cell viability, indicating its central role in replication and repair (32,33). Archaeal RPA/SSB are diverse and display characteristics of both eukaryotic RPA and bacterial SSB, with significant variation in structure, domain organization, and subunit composition. They are nevertheless thought to protect single-stranded intermediates generated during replication, recombination and repair from attack by nucleases and chemical modifications (41–44). Moreover, archaeal RPAs are likely to direct proteins at sites of DNA replication, recombination and repair through direct protein-protein interactions (45–48). Key cellular roles of haloarchaeal RPA proteins have also been suggested by recent genetic studies of the five different RPA homologs in *Halobacterium salinarum* revealing specialized roles depending on the type of DNA damages encountered (49).

We successfully obtained a viable *H. volcanii* strain expressing a GFP::RPA2 fusion from the native chromosomal locus (Figure 1). Our results showed that the GFP::RPA2 fusion protein supported growth, was functional in repair of DNA damages caused by UV irradiation and phleomycin and responded to replication stress caused by the DNA synthesis inhibitor aphidicolin. Combining wide-field imaging and quantitative image analysis, we have demonstrated that GFP-labeled RPA2 proteins form discrete fluorescence foci, referred to as RF, under normal growth conditions (Figure 2). Nascent DNA labeling using a strain engineered during this study revealed that more than 90% of *H. volcanii* cells were actively undergoing DNA replication (Figure 3). These results suggest that a sizeable portion of the observed GFP::RPA2 foci correspond to active replication forks. However, the fact that more RF were detected in living cells than nascent DNA foci in fixed samples may suggest spontaneous accumulation of RPA2 in non-replicative

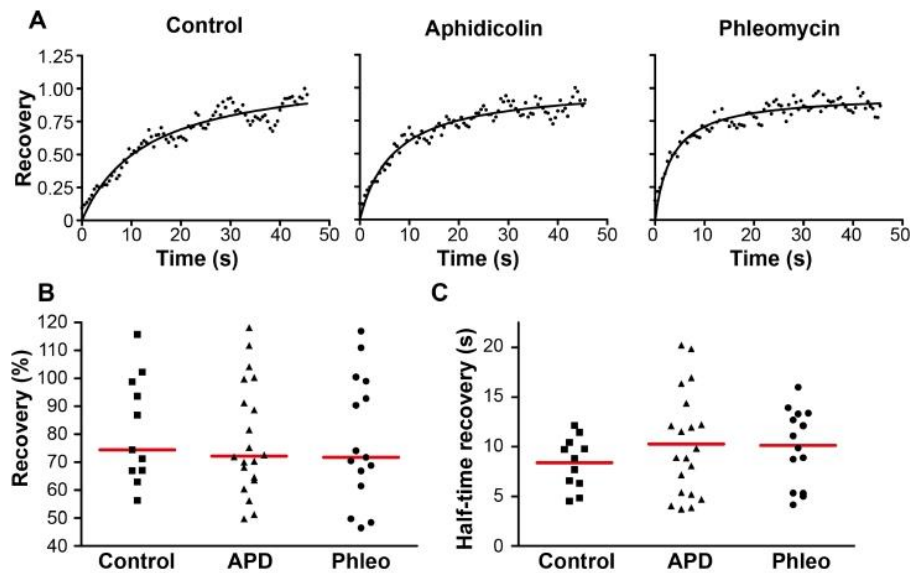


Figure 7. Dynamic localization of GFP-labeled RPA2 molecules at fluorescence foci. A total of 11 control cells, 20 aphidicolin-treated cells and 14 phleomycin-treated cells were analyzed. **(A)** Representative fluorescence recovery measurement (dots) after photobleaching, and the corresponding fitted curve (black line), for each condition. **(B)** Percentage of recovery reached. **(C)** Half-time recovery (s) calculated from the fitted curves. Data for each cell are represented, and the red lines correspond to the means. Unpaired *t*-test with Welch's correction were performed in comparison to control cells and concluded to no significant differences.

chromosomal regions such as stalled or collapsed replication forks or regions of spontaneous DNA damage. Nevertheless, the *in vivo* localization of RPA2 at active RF was further supported by the dynamic response of RPA2 foci to DNA damages induced by UV irradiation. We observed that the number of the GFP::RPA2 foci decreased in cells containing sufficient DNA damage to block replication and impair cell viability. Moreover, the decrease in cell survival induced by UV irradiation correlated with an increased proportion of cells containing a large single GFP::RPA2 focus (Figure 4). *A priori*, this dynamic response could reflect either the stalling of archaeal DNA replication at pyrimidine dimers or, alternatively, a delayed appearance of replication-induced DNA double-strand breaks formed by replication forks encountering UV-induced single-strand lesions. Note that archaeal replicative DNA primases can bypass cyclobutane pyrimidine dimers (50) and UV-induced replication arrest leading to DNA double-strand breaks has already been demonstrated in Archaea (51). In the case of *H. volcanii*, these UV-induced foci could also reflect the bypass of pyrimidine dimers by translesion DNA synthesis, as the genome of this species contains Family-Y DNA polymerase homologous to the bacterial enzyme DinB (31).

In exponentially growing *Haloferax volcanii*, in the vast majority of cells we observed between one and nine RF using GFP::RPA2 fluorescence (Figure 2) or one to five sites of nascently labeled DNA (Figure 3). The number of the detected RF closely followed a Poisson distribution, whereas the number of cells without foci was less than expected by change (Supplementary Figure S4). As the Poisson distribution is the discrete probability distribution describing the number of independent events occurring in a specific time period, our observations have important biological consequences. In particular, our data imply independent forma-

tion of haloarchaeal RF through stochastic processes. This observation is analogous to eukaryotes where spontaneous stochastic firing of individual origins has been proposed (52). Our observations using *H. volcanii* may thus reflect cell-to-cell variability in origin utilization. Alternatively, the heterogeneity of the assembly of replication forks might have been missed in previous studies using cell populations. Note also that our results are very different from what has been previously observed either in bacteria or *Sulfolobus* species mainly carrying two to three RF (7,10,19).

The number of potential active replication forks (more than one hundred without accounting for the two megaplas-mids) is much higher than the number of the observed RF. This suggests that the origin firing and assembly of replication complexes could be regulated *e.g.* by ATP-dependent loading of the MCM helicase at origins by the archaeal Orc1/Cdc6 (53,54). Alternatively, the number of active replisomes could be limited by metabolic cues such as phosphate starvation or DNA precursor availability (22). The fact that the number of cells without RF is very small could also indicate that initiation of DNA replication is an efficient, albeit stochastic, process. However, we cannot exclude the possibility of non-replicating cells being non-viable, at least partially explaining their low observed frequency. Differently from *Sulfolobus* (19), we do not observe a clear association of *H. volcanii* RF with the cell periphery, thus making the role of the cytosolic membrane as regulator or organizer of DNA replication less likely. Our work moreover raises the possibility that not all four chromosomal origins of *H. volcanii* H26 are necessarily simultaneously active in exponentially growing single cells. This proposal is consistent with the fact that a single well-defined bidirectional replication origin on the main chromosome supports the growth of genetically modified *H. volcanii* (23) and *H.*

mediterranea (55) strains. These marker frequency analyses performed by deep-sequencing or whole-genome microarrays of cell populations have also shown that *Haloflex* replication origins differ in terms of their activation or initiation efficiencies, also supported by studies on copy number control of *H. volcanii* replication origins (56). The progression rate of a single replication fork in euryarchaea is estimated at 15–20 kb/min (57), suggesting that the main chromosome of *Haloflex* could be replicated in 90–115 min from a single replication origin. This estimated replication time from a single replication origin is similar to typical doubling time of *H. volcanii*, thus possibly explaining why multiple origins are not an absolute requirement for cell growth in *Haloflex* species.

We also investigated the effect of the DNA polymerase inhibitor aphidicolin on the intracellular localization and quantity of *H. volcanii* RPA2 foci (Figure 5). In comparison to control cells, inhibition of DNA synthesis increased both the cell size [Figure 5C (21)] and the number of GFP::RPA2 foci (Figure 5D), likely reflecting the formation of stalled replication forks. When 3D-SIM microscopy with a lateral resolution of 100 nm was used for quantification, we observed a three- to four-fold increase in the number of the RPA foci in aphidicolin-treated cells when compared to control cells. Closer inspection of our data revealed that aphidicolin creates larger fluorescence foci in (pseudo) wide-field images frequently resolved as two individual closely located foci in SI reconstructed images. A feasible explanation for these observations is that blocking of DNA synthesis by aphidicolin results in ssDNA accumulation at stalled forks and prevents the physical separation of two closely located replication forks. This observation also raises the possibility that the different replication forks/replicons may be spatially co-localized, providing an alternative explanation for the low number of RF observed in live *H. volcanii* cells, as described above. This is of great interest, as whether all copies of the main chromosome are simultaneously replicated in all cells remains unknown.

We also exploited our GFP::RPA2 fusion to investigate the DNA repair dynamics in *H. volcanii* cells by exposing cells to phleomycin, which triggers DNA strand breaks (Figure 5). This compound changed the intracellular localization of RF when compared to untreated cells (Figure 5A and C). In the presence of phleomycin, a single large focus was observed using wide-field microscopy. 3D-SIM resolved these poorly defined foci as up to ten individual foci *per* cell located within the resolution limit of conventional fluorescence microscopy. We also observed a specific DNA compaction of phleomycin-treated cells and the co-localization of RPA2 with compacted DNA (Figure 6). Such DNA compaction has already been observed in the case of *H. volcanii* (40). This may be part of a DNA damage response that facilitates target search of DNA repair proteins and recognition of intact DNA sequences during homologous recombination. Thus, the specific re-localization of RPA2 in UV-irradiated cells (Figure 4) and phleomycin-treated cells (Figure 5) may reflect this DNA damage response.

Our nanoscopy measurements of archaeal replication and repair structures also provide the first estimates for the diameter of archaeal DNA replication and repair structures

in living cells. For instance, we provide a median size estimate of approximately 150 nm, with a range from 80 nm to 250 nm, for RPA2 foci both in control and aphidicolin treated cells (Figures 5E and F). This median value and size heterogeneity are very similar to what has been attributed in earlier studies to the replication domains in human cells using optical super-resolution (16) and electron microscopy (15). In eukaryotes, very recent studies have suggested that on average these replication units of 150 nm correspond to the sites of DNA replication with four co-replicating DNA segments of approximately 20 kb (18,58). As *H. volcanii* replication origins are separated by several hundreds of kilobases (24), we find it unlikely that several clustered *cis*-acting replication origins would be simultaneously processed. Further microscopy studies with improved optical resolution and more efficient nascent DNA labeling (with shorter pulses) are required to further investigate this point. Strikingly, phleomycin-induced repair foci were systematically smaller than RF in control and aphidicolin-treated cells (Figure 5), suggesting that a smaller amount of ssDNA is covered by RPA2. Our FRAP analyses showed that the immobile portion and diffusion properties of RPA2 are very similar under all three conditions (Figure 7), indicating that the biochemical properties of RPA2 molecules are not modulated in the three cases. These *in vivo* observations are fully compatible with earlier *in vitro* studies on archaeal single-stranded DNA binding proteins that have indicated that (hyper)thermophilic or halophilic RPA proteins bind ssDNA with very high affinity in a sequence-independent manner (47,59), but that they also physically interact with other DNA replication, repair and recombination proteins (46).

In conclusion, using wide-field and 3D-SIM super-resolution live cell imaging, as well as nascent DNA labeling, we have provided unexpected insight into the intracellular dynamics of archaeal DNA replication and repair. The small number of the observed RF is unexpected suggesting the presence of regulatory factors of haloarchaeal replication that remain to be identified. Stochastic cell-to-cell variation of RF formation is also of interest to further our still limited understanding on how DNA replication of many replicons found in *H. volcanii* is achieved. We also observe that inhibition of DNA synthesis and chemical agents creating DNA breaks result in the reorganization and/or re-localization of RPA2 complexes. As Archaea and Eukarya share homologous DNA replication and repair proteins, a basic unit of DNA replication may have evolved prior to the divergence of these two domains of life. Altogether our results underline the great potential of live cell imaging to unravel molecular details of fundamental molecular processes in the Third domain of life.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Marie-Claire Schanne-Klein for the use of the ZEISS Observer microscope and thoughtful discussions. We also thank Marten Vos for help in data fitting.

FUNDING

Agence Nationale de la Recherche [ANR-10-ANR-11-EQPX-0029 Morphoscope2 and ANR-09-PIRI-0019 RETID(Y)NA] (in part). Funding for open access charge: INSERM and CNRS.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

1. Myllykallio, H., Lopez, P., Lopez-Garcia, P., Heilig, R., Saurin, W., Zivanovic, Y., Philippe, H. and Forterre, P. (2000) Bacterial mode of replication with eukaryotic-like machinery in a hyperthermophilic archaeon. *Science*, **288**, 2212–2215.
2. Robinson, N.P., Dionne, I., Lundgren, M., Marsh, V.L., Bernander, R. and Bell, S.D. (2004) Identification of two origins of replication in the single chromosome of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Cell*, **116**, 25–38.
3. Edgell, D.R. and Doolittle, W.F. (1997) Archaea and the origin(s) of DNA replication proteins. *Cell*, **89**, 995–998.
4. Matsunaga, F., Norais, C., Forterre, P. and Myllykallio, H. (2003) Identification of short 'eukaryotic' Okazaki fragments synthesized from a prokaryotic replication origin. *EMBO Rep.*, **4**, 154–158.
5. Jensen, R.B., Wang, S.C. and Shapiro, L. (2001) A moving DNA replication factory in *Caulobacter crescentus*. *EMBO J.*, **20**, 4952–4963.
6. Berkmen, M.B. and Grossman, A.D. (2006) Spatial and temporal organization of the *Bacillus subtilis* replication cycle. *Mol. Microbiol.*, **62**, 57–71.
7. Reyes-Lamothe, R., Possoz, C., Danilova, O. and Sherratt, D.J. (2008) Independent positioning and action of *Escherichia coli* replisomes in live cells. *Cell*, **133**, 90–102.
8. Reyes-Lamothe, R., Sherratt, D.J. and Leake, M.C. (2010) Stoichiometry and architecture of active DNA replication machinery in *Escherichia coli*. *Science*, **328**, 498–501.
9. Moolman, M.C., Krishnan, S.T., Kerssemakers, J.W., van den Berg, A., Tulinski, P., Depken, M., Reyes-Lamothe, R., Sherratt, D.J. and Dekker, N.H. (2014) Slow unloading leads to DNA-bound beta-2-sliding clamp accumulation in live *Escherichia coli* cells. *Nat. Commun.*, **5**, 5820.
10. Mangiameli, S.M., Veit, B.T., Merrikh, H. and Wiggins, P.A. (2017) The replisomes remain spatially proximal throughout the cell cycle in bacteria. *PLoS Genet.*, **13**, e1006582.
11. Reinhart, M. and Cardoso, M.C. (2017) A journey through the microscopic ages of DNA replication. *Protoplasma*, **254**, 1151–1162.
12. Chagin, V.O., Stear, J.H. and Cardoso, M.C. (2010) Organization of DNA replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a000737.
13. Baddeley, D., Chagin, V.O., Schermelleh, L., Martin, S., Pombo, A., Carlton, P.M., Gahl, A., Domaing, P., Birk, U., Leonhardt, H. et al. (2010) Measurement of replication structures at the nanometer scale using super-resolution light microscopy. *Nucleic Acids Res.*, **38**, e8.
14. Cseresnyes, Z., Schwarz, U. and Green, C.M. (2009) Analysis of replication factories in human cells by super-resolution light microscopy. *BMC Cell Biol.*, **10**, 88.
15. Koberna, K., Ligasova, A., Malinsky, J., Pliss, A., Siegel, A.J., Cvackova, Z., Fidlerova, H., Masata, M., Fialova, M., Raska, I. et al. (2005) Electron microscopy of DNA replication in 3-D: evidence for similar-sized replication foci throughout S-phase. *J. Cell Biochem.*, **94**, 126–138.
16. Chagin, V.O., Casas-Delucchi, C.S., Reinhart, M., Schermelleh, L., Markaki, Y., Maiser, A., Bolius, J.J., Bensimon, A., Fillies, M., Domaing, P. et al. (2016) 4D Visualization of replication foci in mammalian cells corresponding to individual replisomes. *Nat. Commun.*, **7**, 11231.
17. Saner, N., Karschau, J., Natsume, T., Gierlinski, M., Retkute, R., Hawkins, M., Nieduszynski, C.A., Blow, J.J., de Moura, A.P. and Tanaka, T.U. (2013) Stochastic association of neighboring replisomes creates replication factories in budding yeast. *J. Cell Biol.*, **202**, 1001–1012.
18. Xiang, W., Roberti, M.J., Heriche, J.K., Huet, S., Alexander, S. and Ellenberg, J. (2018) Correlative live and super-resolution imaging reveals the dynamic structure of replication domains. *J. Cell Biol.*, **217**, 3315–3316.
19. Gristwood, T., Duggin, I.G., Wagner, M., Albers, S.V. and Bell, S.D. (2012) The sub-cellular localization of *Sulfolobus* DNA replication. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 5487–5496.
20. Martinez-Alvarez, L., Deng, L. and Peng, X. (2017) Formation of a viral replication focus in *Sulfolobus* cells infected by the ruidivirus *Sulfolobus islandicus* Rod-Shaped virus 2. *J. Virol.*, **91**, e00486–17.
21. Lestini, R., Laptinok, S.P., Kuhn, J., Hink, M.A., Schanne-Klein, M.C., Liebl, U. and Myllykallio, H. (2013) Intracellular dynamics of archaeal FANCM homologue Hef in response to halted DNA replication. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 10358–10370.
22. Zerulla, K. and Soppa, J. (2014) Polyploidy in haloarchaea: advantages for growth and survival. *Front. Microbiol.*, **5**, 274.
23. Hawkins, M., Malla, S., Blythe, M.J., Nieduszynski, C.A. and Allers, T. (2013) Accelerated growth in the absence of DNA replication origins. *Nature*, **503**, 544–547.
24. Norais, C., Hawkins, M., Hartman, A.L., Eisen, J.A., Myllykallio, H. and Allers, T. (2007) Genetic and physical mapping of DNA replication origins in *Haloflex volcanii*. *PLoS Genet.*, **3**, e77.
25. Ammar, R., Torti, D., Tsui, K., Gebbia, M., Durbic, T., Bader, G.D., Gaever, G. and Nislow, C. (2012) Chromatin is an ancient innovation conserved between Archaea and Eukarya. *Elife*, **1**, e00078.
26. Mattioli, F., Bhattacharyya, S., Dyer, P.N., White, A.E., Sandman, K., Burkhardt, B.W., Byrne, K.R., Lee, T., Ahn, N.G., Santangelo, T.J. et al. (2017) Structure of histone-based chromatin in Archaea. *Science*, **357**, 609–612.
27. Allers, T., Ngo, H.P., Mevarech, M. and Lloyd, R.G. (2004) Development of additional selectable markers for the halophilic archaeon *Haloflex volcanii* based on the *leuB* and *trpA* genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 943–953.
28. Bitan-Banin, G., Ortenberg, R. and Mevarech, M. (2003) Development of a gene knockout system for the halophilic archaeon *Haloflex volcanii* by use of the *pyrE* gene. *J. Bacteriol.*, **185**, 772–778.
29. Lestini, R., Duan, Z. and Allers, T. (2010) The archaeal Xpf/Mus81/FANCM homolog Hef and the Holliday junction resolvase Hjc define alternative pathways that are essential for cell viability in *Haloflex volcanii*. *DNA Repair (Amst.)*, **9**, 994–1002.
30. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B. et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*, **9**, 676–682.
31. Hartman, A.L., Norais, C., Badger, J.H., Delmas, S., Haldenby, S., Madupu, R., Robinson, J., Khouri, H., Ren, Q., Lowe, T.M. et al. (2010) The complete genome sequence of *Haloflex volcanii* DS2, a model archaeon. *PLoS One*, **5**, e9605.
32. Stroud, A., Liddell, S. and Allers, T. (2012) Genetic and Biochemical Identification of a Novel Single-Stranded DNA-Binding Complex in *Haloflex volcanii*. *Front. Microbiol.*, **3**, 224.
33. Skowrya, A. and MacNeill, S.A. (2012) Identification of essential and non-essential single-stranded DNA-binding proteins in a model archaeal organism. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 1077–1090.
34. Reuter, C.J. and Maupin-Furlow, J.A. (2004) Analysis of proteolysis in *Haloflex volcanii* cells, using short-lived green fluorescent proteins. *Appl Environ. Microbiol.*, **70**, 7530–7538.
35. Forterre, P., Elie, C. and Kohiyama, M. (1984) Aphidicolin inhibits growth and DNA synthesis in halophilic archaebacteria. *J. Bacteriol.*, **159**, 800–802.
36. Myllykallio, H., Leduc, D., Filee, J. and Liebl, U. (2003) Life without dihydrofolate reductase *FolA*. *Trends Microbiol.*, **11**, 220–223.
37. Ortenberg, R., Rozenblatt-Rosen, O. and Mevarech, M. (2000) The extremely halophilic archaeon *Haloflex volcanii* has two very different dihydrofolate reductases. *Mol. Microbiol.*, **35**, 1493–1505.
38. Gustafsson, M.G. (2000) Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.*, **198**, 82–87.
39. Duan, Z. (2009) Genetic analysis of two structure-specific endonucleases Hef and Fen1 in archaeon *Haloflex volcanii*. PhD thesis. University of Nottingham.
40. Delmas, S., Duggin, I.G. and Allers, T. (2013) DNA damage induces nucleoid compaction via the Mre11-Rad50 complex in the archaeon *Haloflex volcanii*. *Mol. Microbiol.*, **87**, 168–179.
41. Haseltine, C.A. and Kowalczykowski, S.C. (2002) A distinctive single-strand DNA-binding protein from the Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol. Microbiol.*, **43**, 1505–1515.

42. Wadsworth, R.I. and White, M.F. (2001) Identification and properties of the crenarchaeal single-stranded DNA binding protein from *Sulfolobus solfataricus*. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 914–920.
43. Chedin, F., Seitz, E.M. and Kowalczykowski, S.C. (1998) Novel homologs of replication protein A in archaea: implications for the evolution of ssDNA-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 273–277.
44. Kelly, T.J., Simancek, P. and Brush, G.S. (1998) Identification and characterization of a single-stranded DNA-binding protein from the archaeon *Methanococcus jannaschii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 14634–14639.
45. Rolfmeier, M.L. and Haseltine, C.A. (2010) The single-stranded DNA binding protein of *Sulfolobus solfataricus* acts in the presynaptic step of homologous recombination. *J. Mol. Biol.*, **397**, 31–45.
46. Cubeddu, L. and White, M.F. (2005) DNA damage detection by an archaeal single-stranded DNA-binding protein. *J. Mol. Biol.*, **353**, 507–516.
47. Robbins, J.B., Murphy, M.C., White, B.A., Mackie, R.I., Ha, T. and Cann, I.K. (2004) Functional analysis of multiple single-stranded DNA-binding proteins from *Methanosarcina acetivorans* and their effects on DNA synthesis by DNA polymerase BI. *J. Biol. Chem.*, **279**, 6315–6326.
48. Komori, K. and Ishino, Y. (2001) Replication protein A in *Pyrococcus furiosus* is involved in homologous DNA recombination. *J. Biol. Chem.*, **276**, 25654–25660.
49. Evans, J.J., Gygli, P.E., McCaskill, J. and DeVeaux, L.C. (2018) Divergent roles of RPA homologs of the model archaeon halobacterium *salinarum* in survival of DNA damage. *Genes (Basel)*, **9**, E223.
50. Jozwiakowski, S.K., Borazjani Gholami, F. and Doherty, A.J. (2015) Archaeal replicative primases can perform translesion DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **112**, E633–E638.
51. Frols, S., Gordon, P.M., Panlilio, M.A., Duggin, I.G., Bell, S.D., Sensen, C.W. and Schleper, C. (2007) Response of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* to UV damage. *J. Bacteriol.*, **189**, 8708–8718.
52. Löb, D., Lengert, N., Chagin, V.O., Reinhart, M., Casas-Delucchi, C.S., Cardoso, M.C. and Drossel, B. (2016) 3D replicon distributions arise from stochastic initiation and domino-like DNA replication progression. *Nat. Commun.*, **7**, 11207.
53. Matsunaga, F., Forterre, P., Ishino, Y. and Myllykallio, H. (2001) In vivo interactions of archaeal Cdc6/Orc1 and minichromosome maintenance proteins with the replication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 11152–11157.
54. Samson, R. Y., Abeyrathne, P.D. and Bell, S.D. (2016) Mechanism of archaeal MCM helicase recruitment to DNA replication origins. *Mol. Cell*, **61**, 287–296.
55. Yang, H., Wu, Z., Liu, J., Liu, X., Wang, L., Cai, S. and Xiang, H. (2015) Activation of a dormant replication origin is essential for *Haloferax mediterranei* lacking the primary origins. *Nat. Commun.*, **6**, 8321.
56. Maurer, S., Ludt, K. and Soppa, J. (2018) Characterization of copy number control of two *haloferax volcanii* replication origins using deletion mutants and haloarchaeal artificial chromosomes. *J. Bacteriol.*, **200**, e00517-17.
57. O'Donnell, M., Langston, L. and Stillman, B. (2013) Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a010108.
58. Triemer, T., Messikommer, A., Glasauer, S.M.K., Alzeer, J., Paulisch, M.H. and Luedtke, N.W. (2018) Superresolution imaging of individual replication forks reveals unexpected produg resistance mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **115**, E1366–E1373.
59. Kerr, I.D., Wadsworth, R.I., Cubeddu, L., Blankenfeldt, W., Naismith, J.H. and White, M.F. (2003) Insights into ssDNA recognition by the OB fold from a structural and thermodynamic study of *Sulfolobus* SSB protein. *EMBO J.*, **22**, 2561–2570.

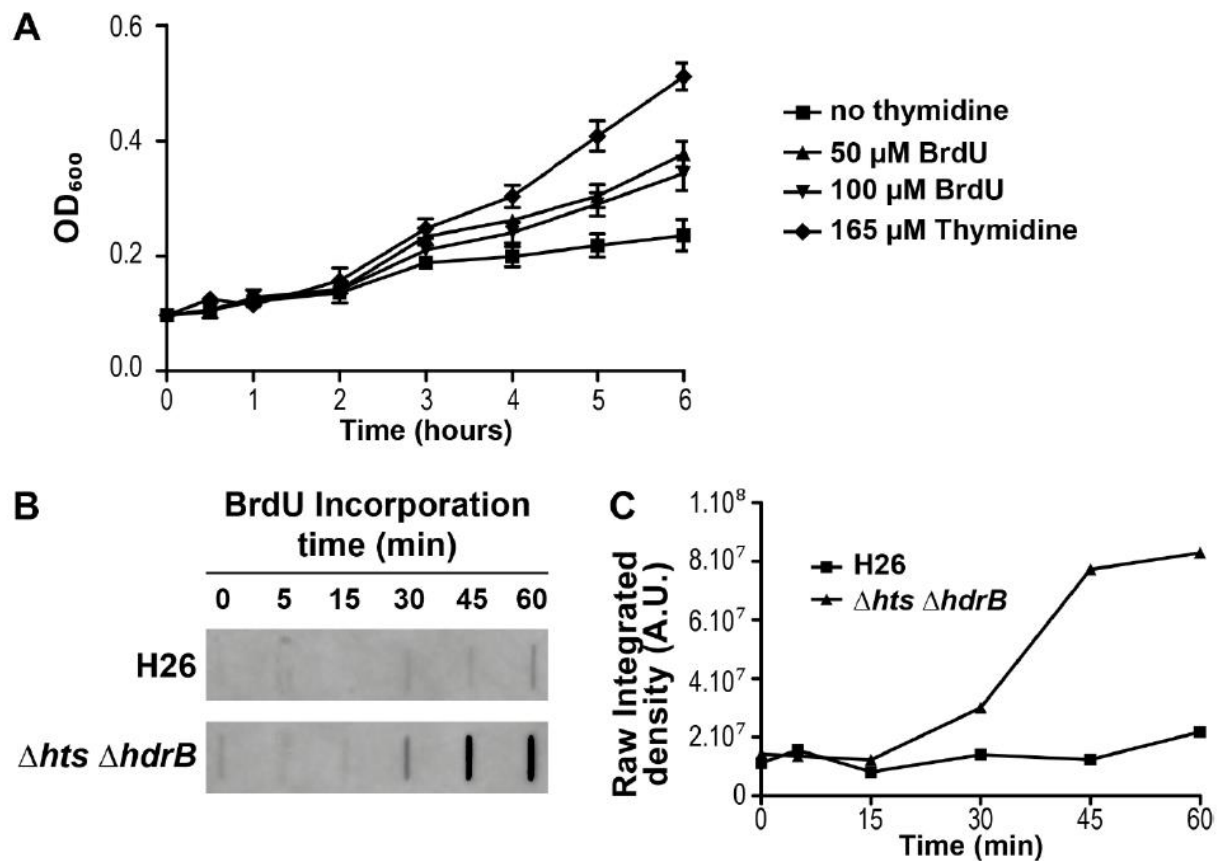


Figure S1: BrdU incorporation in *H.volcanii* $\Delta hts \Delta hdrB$ cells. (A) Growth curves of $\Delta hts \Delta hdrB$ cells in rich media (YPC) (■), or in rich media supplemented with 50 μ M BrdU (▲), with 100 μ M BrdU (▼) or with 165 μ M thymidine (◆). (B) Representative BrdU signal detected by slot-blot analysis of 200ng of genomic DNA after growth in YPC + 100 μ M BrdU. H26 cells were compared to $\Delta hts \Delta hdrB$ cells. (C) Signal quantification of the signal shown panel B using Fiji. “Substract Background” was performed with a rolling ball radius of 25, then signal was measured for each sample using a single-sized ROI.

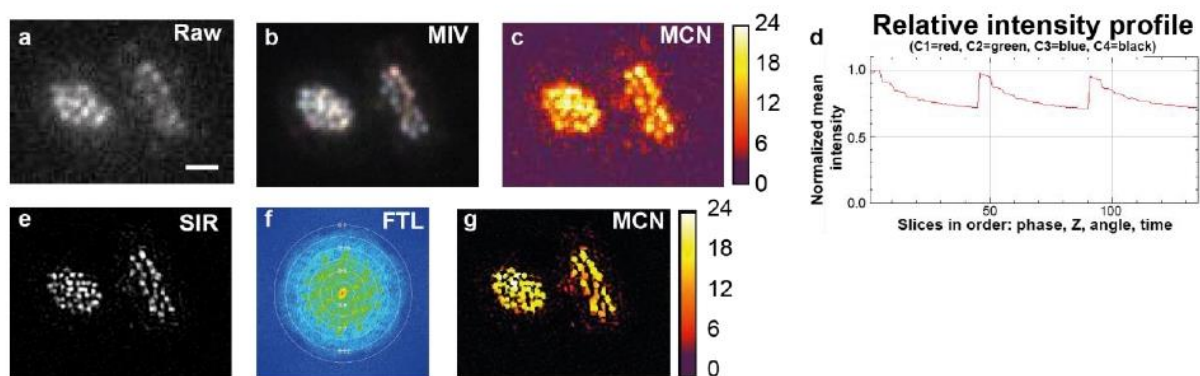


Figure S2: SIMcheck output for raw (a-d) and SIM reconstructed (e-g) data. Scale bar 1.0 μm . (a) Representative image from a raw 3D-SIM data. (b) Output image MIV (Motion and illumination variation) indicating motion stability and evenness of the illumination. (c) Final representation of a heatmap of local modulation of the contrast-to-noise ratio (MCNR) used to optimize the acquisition parameters. (d) Relative intensity profiles according to phase, Z and angle indicating the rate of bleaching and the relative intensity of the illumination pattern for each illumination angle. (e) Representative SIM reconstructed image. (f) Fourier spectra display of lateral FFT illustrating the effective spatial resolution. (g) Output image MCN (Modulation contrast to noise) showing the local variations in reconstruction quality.

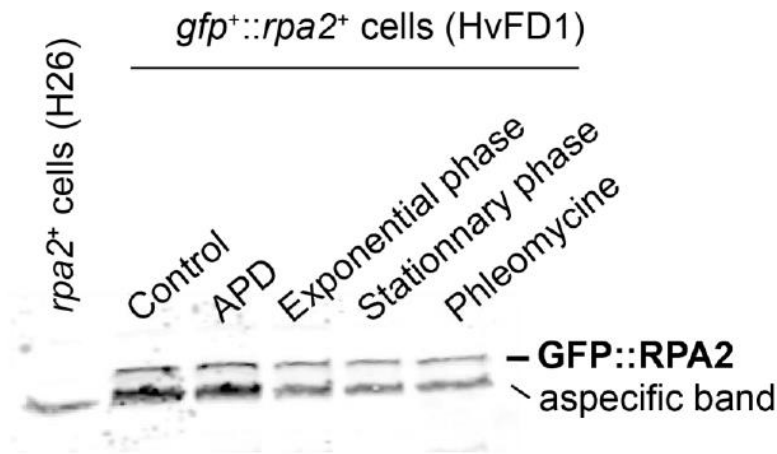
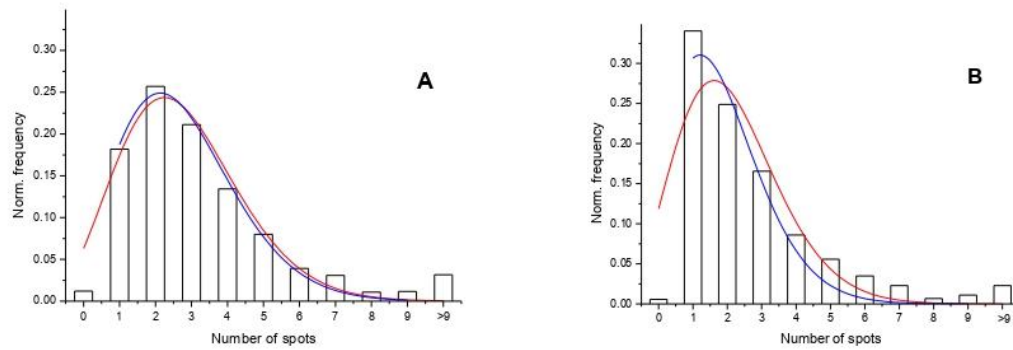


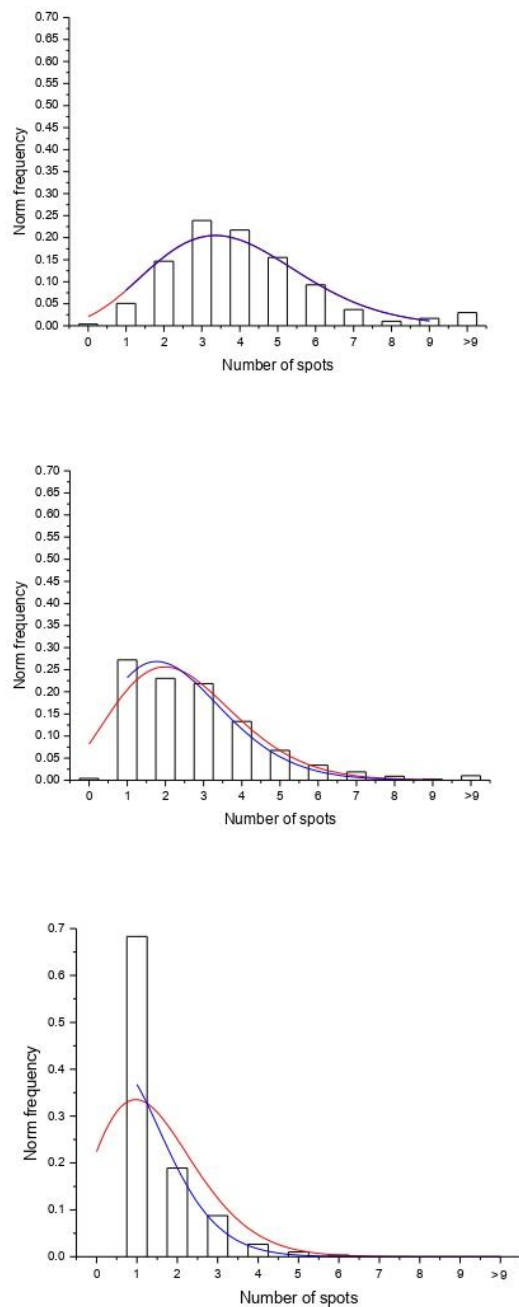
Figure S3: Western-blot to reveal GFP::RPA2 molecules in crude extract using antibodies against GFP. For each condition, lysis of an equal quantity of cells was performed in [2M KCl – 10 mM HEPES – pH 7] by sonication. Lysats were centrifuged 1 hour at 4°C. Proteins from supernatants were separated by electrophoresis in denaturing conditions using NuPAGE 4-12% Bis-Tris Protein Gels (ThermoFisher Scientific) following manufacturer instructions. Proteins were transferred on a nitrocellulose membrane and GFP::RPA2 proteins were revealed using a primary antibody against GFP (1/5000) (ORIGENE) and a secondary antibody against rabbit antibodies coupled to IRDye 680 (LICOR). Signal was revealed using a Licor Odyssey Imaging system. A band specific to GFP::RPA2 was revealed with an apparent molecular weight of 120 kDa, higher than the expected molecular weight of 80 kDa, which is often the case with halophilic proteins. Three independent experiments were performed, and results from a representative western blot was shown.

Figures S4A and S4B



Figures S4A and S4B: The observed number of RF (“spots”) fitted using a Poisson function using the average of the distribution as the only fit parameter. In both panels the red plots are fits to points from 0-9 number of spots: for the blue curves the point at 0 number of spots is excluded from the fit. The mean values for the number of spots corresponding to the red and blue curves are 2.76 ± 0.12 and 2.65 ± 0.06 (panel A) and 2.1 ± 0.2 and 1.73 ± 0.12 (panel B). Panels A and B refer to **Figure 2B** of the main manuscript.

Figures S4C



Figures S4C: The fits are to a Poisson distribution with only fit parameter the average of the distribution (referring to **Figure 4D** of the main manuscript). In both panels the red plots are fits to points from 0-9 number of spots: for the blue curves the point at 0 number of spots is excluded from the fit. The mean values for the number of spots corresponding to the red and blue curves are 3.87 ± 0.15 and 3.86 ± 0.15 (upper, no UV treatment), 2.5 ± 0.2 and 2.39 ± 0.11 (50 J/m^2 , middle) and 1.5 ± 0.4 and 1.0 ± 0.5 (100 J/m^2 , lower).

Supplementary Table S1. Oligonucleotides used during this work.

Primer	Sequence (5' to 3')	Comments/use
Construction of <i>H. volcanii</i> <i>gfp</i>⁺::<i>rpa2</i>⁺ strain		
RL129	CGACGCGGAGAACTGCGCC	Amplification of the up-stream region of <i>rpa2</i>
RL130	<u>AGTTCCTCGCCTTTCGACATCAGGCGTCACCTCCC</u> GG	Amplification of the up-stream region of <i>rpa2</i> , underlined sequence is complementary to <i>gfp</i>
RL85bis	ATGTCGAAAGGCGAGGAACTCTTC	Amplification of <i>gfp</i>
RL124	CGACCGGTAGGCGTAGCCGC	Amplification of <i>gfp</i>
RL131	<u>GCGGCTACGCCTACCGGTCGATGGGCGTCATCCGG</u> GAGG	Amplification of the 5' region of <i>rpa2</i> , underlined sequence is complementary to <i>gfp</i>
RL132	AGGTTCTCCTTCGCGCCG	Amplification of the 5' region of <i>rpa2</i>
BSF2	TTAAGTTGGGTAACGCCAGGG	Screening for fusion construct starting from "white" colonies
BSR3	ACCCAGGCTTTACACTTTATGC	Screening for fusion construct from "white" colonies
RL141	GCCAGTGTGGACTTCGACCG	Confirmation of the <i>gfp</i> ⁺ :: <i>rpa2</i> ⁺ at the native locus
RL165	GACGGTTACGATGTGAACTCC	Confirmation of the <i>gfp</i> ⁺ :: <i>rpa2</i> ⁺ at the native locus
Construction of <i>H. volcanii</i> Δ<i>hts</i> Δ<i>hdrB</i> strain		
RL208	CGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTGGCGA GTCGCGACGCTCGGGC	Upstream (US) region of <i>hts</i> <i>hdrB</i> operon
RL209	TTTGTACTCCCACTCGCCCGAGTTACTCATGAGAG GTGCCCTGGTTGGGTG	Upstream (US) region of <i>hts</i> <i>hdrB</i> operon
RL210	GACGACCAACACCCAACCAGGGCACCTCTCATGA GTAACCTCGGGCGAGTGG	Downstream (DS) region of <i>hts</i> <i>hdrB</i> operon
RL211	AAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCACGC GAGTCTGCGTCGGCTCC	Downstream (DS) region of <i>hts</i> <i>hdrB</i> operon
RL52	ATGAGCGGCGAGGAGCTTTCTGG	Preparation of the DIG-labeled probe
RL53	TTACTCATCGGATTCCTCCG	Preparation of the DIG-labeled probe

Supplementary Table S2. Generation times of *H. volcanii* strains (in hours).

Pairwise measurements	<i>rpa2</i> ⁺	<i>gfp</i> ⁺ :: <i>rpa2</i> ⁺
1	2.08	2.87
2	1.81	1.87
3	1.42	1.90
4	1.65	2.37
5	2.49	2.13
average ± SD	1.9 ± 0.4	2.2 ± 0.4

Suite à la publication de ces résultats, j'ai poursuivi la caractérisation des foyers formés par l'ADN néosynthétisé.

Peut-on mettre en évidence une colocalisation des foyers GFP::RPA2 et des foyers formés par l'ADN néosynthétisé ?

Afin d'approfondir la caractérisation des foyers GFP::RPA2, des premiers tests de co-localisation des foyers de BrdU et des foyers RPA2 ont été effectués chez la souche *gfp::rpa2 ΔhtsΔhdrB* (HvYC1), mais le signal GFP est perdu lors du traitement des cellules nécessaire à la détection du BrdU incorporé. Le protocole de marquage avec la BrdU nécessite donc une optimisation pour permettre la co-localisation de la GFP et de la BrdU, d'autant plus que le signal de fluorescence dans les cellules vivantes est relativement faible car la protéine RPA2 n'est pas exprimée en forte quantité. Plusieurs pistes d'ordre technique sont à envisager : il semblerait qu'une fixation longue (ici une semaine), ou/et l'utilisation d'une forte concentration de formaldéhyde (ici 4%), ait tendance à réduire le signal de fluorescence ((Sullivan, Kay, and American Society for Cell Biology. 1999) p176). On peut donc envisager une fixation plus courte avec une concentration de formaldéhyde à 1%. Une seconde piste à explorer concerne l'utilisation du formamide pour la dénaturation de l'ADN (Sullivan, Kay, and American Society for Cell Biology. 1999), qui est ici utilisé à 35% pendant 30 minutes à 45°C. Des tests visant à réduire cette durée doivent être effectués. Nous avons également tenté de détecter la GFP par immunodétection, mais il semblerait que les conditions nécessaires à l'immunodétection de la BrdU ne permettent pas l'immunodétection de la GFP.

Suivi du nombre de foyers de BrdU au cours de la prolifération cellulaire

Le suivi du nombre de foyers de répllication au cours du temps en présence de BrdU révèle une augmentation de nombre de foyers jusqu'à 4 foyers en moyenne (Fig. 34c/35a) après une culture *over-night* (16 heures). Comme pour les foyers GFP::RPA2, une grande variabilité du nombre de foyers entre cellules est observé (Fig. 35b) Une culture *over-night* n'est plus en phase exponentielle de croissance, et les cellules, qui ont subi plusieurs divisions, ont répliqué entièrement et plusieurs fois leur ADN. Les foyers correspondant à

une localisation du BrdU correspondent-ils donc à de l'ADN néosynthétisé ? On peut se demander à quoi correspondent ces foyers ? Pourquoi il y a accumulation de foyers, plutôt qu'une diffusion dans l'ensemble de la cellule du signal de BrdU ? Il est important de rappeler que la croissance *over-night* en présence de BrdU entraîne un ralentissement de la prolifération pouvant refléter un effet limitant de l'incorporation de BrdU dans l'ADN, voire un effet toxique (peut-être lié à la difficulté de répliquer un ADN matrice contenant l'analogue). Plusieurs hypothèses peuvent néanmoins être proposées. Les foyers de BrdU peuvent correspondre à des zones actives de la réplication en grand nombre dans des cellules à croissance plus lente. Alternativement, ils pourraient refléter une organisation particulière du chromosome qui serait héritée des cellules mères précédentes et qui concentrerait localement le BrdU incorporé à l'ADN. Enfin, ils pourraient également refléter une présence irrégulière du BrdU sur le chromosome, par exemple due à des mécanismes de réparation.

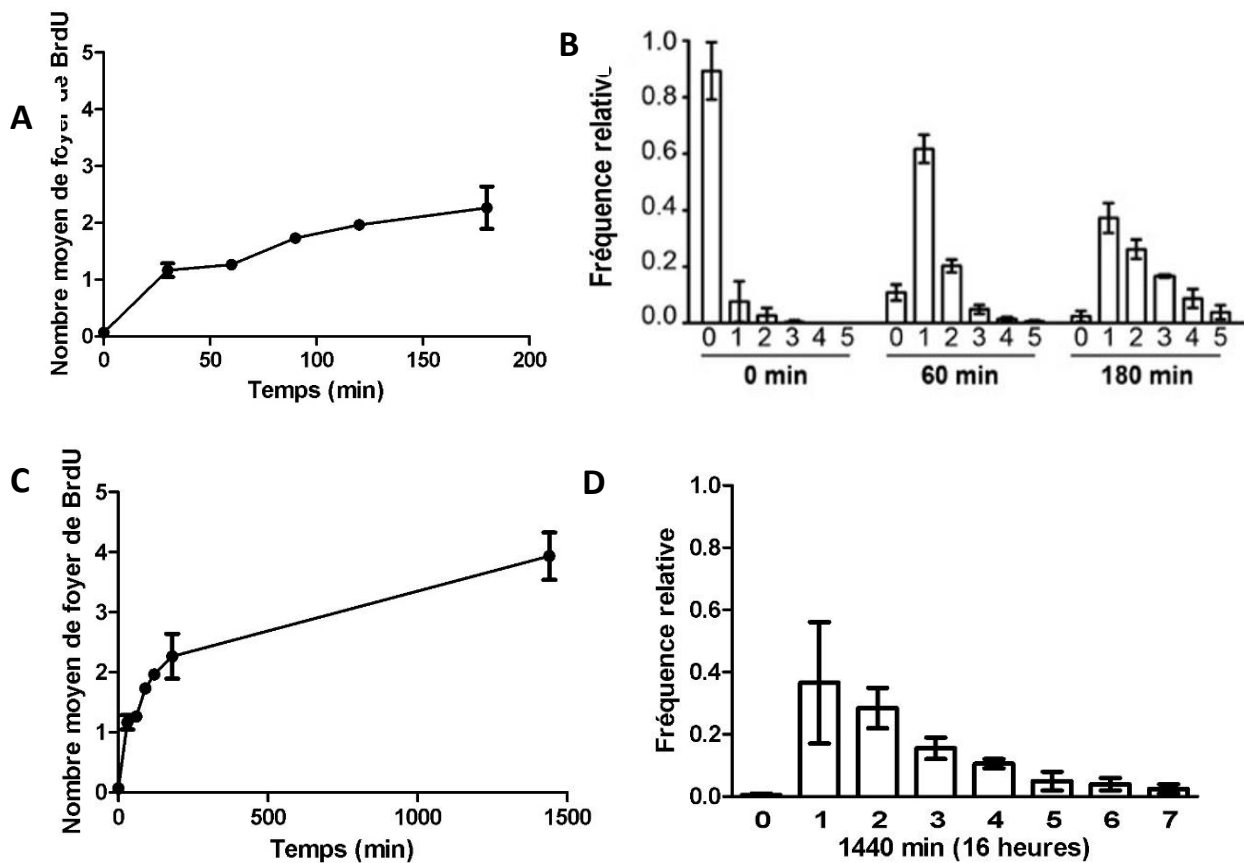


Figure 34 : Localisation intracellulaire de l'ADN néosynthétisé. 163 cellules ont été analysées pour le temps de culture 0 min, 139 pour le temps 30 min, 281 pour le temps 60 min, 951 pour le temps 120 min, 260 pour le temps 180 min, et 979 pour le temps 1440 min (16h). Les figures 33a et 33b ont été présentées dans l'article suivant (Delpech et al. 2018). (A) Nombre moyen de foyers de fluorescence de BrdU observés dans des cellules en phase exponentielle de croissance jusqu'à 180 min de croissance. (B) Fréquence relative du nombre de foyers de BrdU observés dans les cellules. (C) Nombre moyen de foyers de fluorescence de BrdU observés dans des cellules en phase exponentielle de croissance jusqu'à 1440 min (16h) de croissance. (D) Fréquence relative du nombre de foyers de BrdU observés dans les cellules après 1440 min de culture (16h).

A quoi correspondent ces foyers de BrdU ?

Pour suivre le devenir d'un foyer formé pendant la synthèse de l'ADN, j'ai effectué une culture en présence de BrdU pendant 30 minutes, puis ai lavé la culture du BrdU pour la remplacer par de la thymidine (sevrage en BrdU).

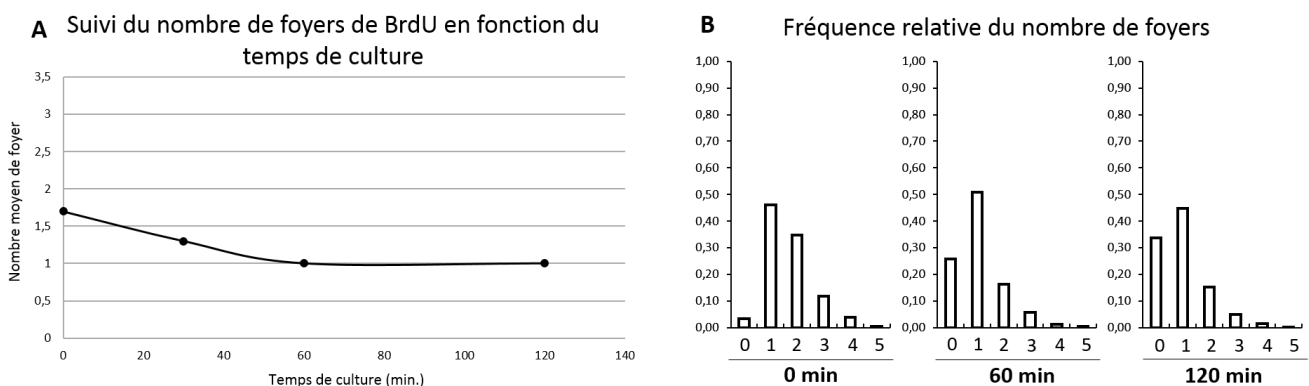


Figure 35 : Exemple représentatif du suivi du nombre de foyers de BrdU dans la souche HvYC0 après une culture de 30 min en présence de BrdU et sevrage (l'absence de barres d'erreurs est due à l'absence de triplcat). 935 cellules ont été analysées pour le temps 0 min, 349 pour le temps 60 min et 884 pour 120 min. (A) Suivi du nombre moyen de foyers par cellule en fonction du temps. (B) Fréquence relative du nombre de foyers par cellule.

Après 30 minutes de culture en présence de BrdU, on observe l'apparition d'en moyenne presque deux foyers de BrdU par cellule. Ce nombre moyen de foyers de BrdU par cellule décroît avec le temps lorsque la culture est sevrée en BrdU (Fig. 35a). Après 120 minutes de culture sans BrdU, une cellule sur trois ne présente plus de foyer, et le nombre de foyers par cellule diminue pour l'ensemble de la population (Fig. 35b). Au-delà de 120 minutes de croissance, il devient difficile de suivre l'évolution du signal, celui-ci devenant trop faible.

On constate donc avec ces résultats que les foyers de BrdU ont tendance à disparaître lors de la réplication s'ils ne sont plus alimentés en BrdU. Deux hypothèses sont possibles : soit la BrdU disparaît de l'ADN, peut-être à cause de mécanismes de réparation de l'ADN, ou la BrdU n'est plus assez concentrée localement pour qu'elle soit détectable. Cette seconde hypothèse implique que l'ADN néosynthétisé possède une organisation particulière lorsque la machinerie de réplication est proche, permettant de visualiser les

foyers d'ADN néosynthétisé, et qui disparaît ensuite quand la machinerie s'éloigne et libère ces contraintes sur l'ADN.

La souche Δori (HvYC4) possède-t-elle un profil différent ?

Des expériences similaires de localisation des foyers de BrdU ont été effectuées avec la souche $\Delta hts \Delta hdrB \Delta ori$ (HvYC4). L'objectif est de comparer le nombre de foyers de BrdU par rapport à la souche $\Delta hts \Delta hdrB$ (HvYC0) lors de culture en phase exponentielle de croissance.

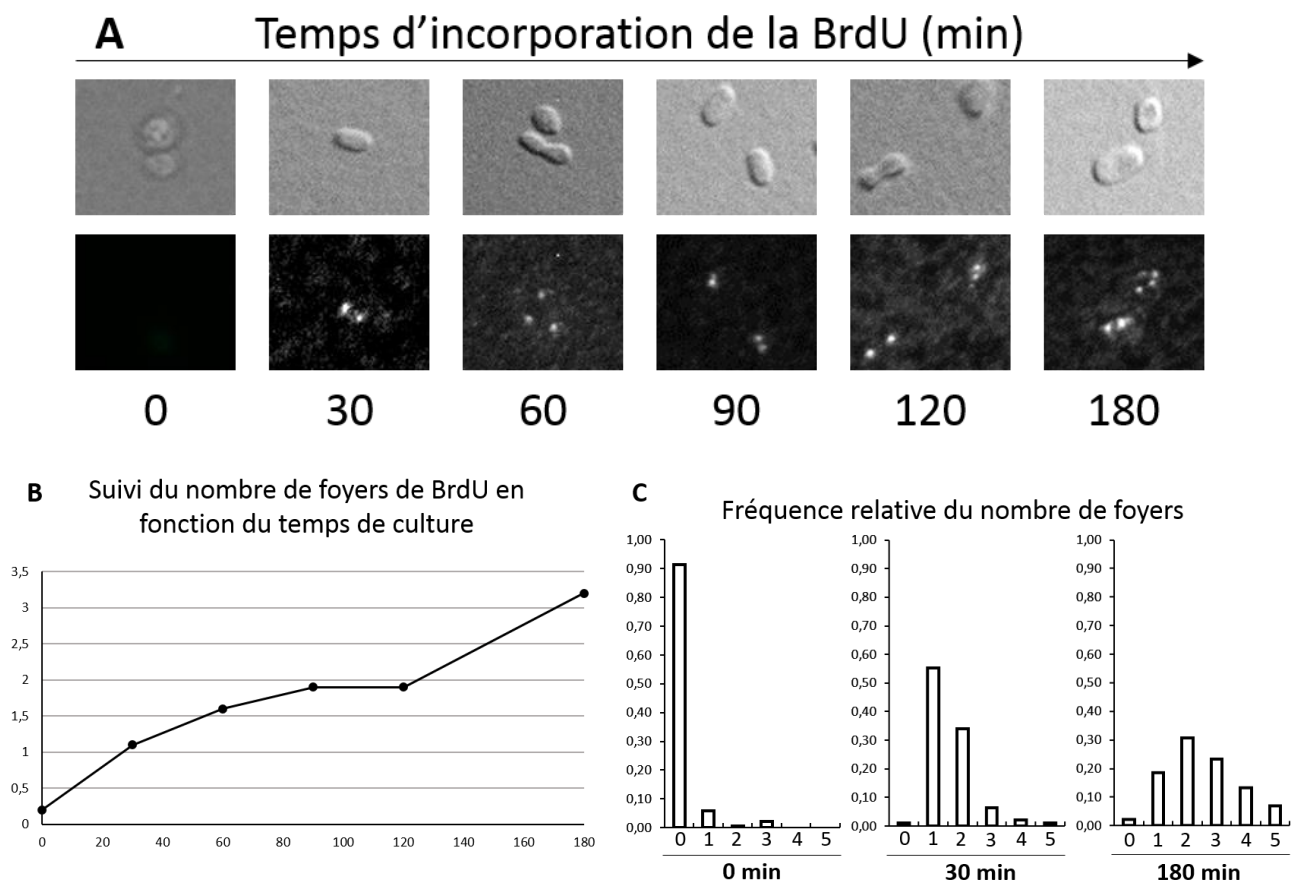


Figure 36 : Localisation intracellulaire des foyers de BrdU dans la souche $\Delta hts \Delta hdrB \Delta ori$ (HvYC4) (l'absence de barres d'erreurs est due à l'absence de triplcat). 84 cellules ont été analysées pour le temps 0 min, 205 pour 30 min, 464 pour 60 min, 790 pour 90 min, 480 pour 120 min et 737 pour 180 min. (A) DIC et signal de Fluorescence. (B) Evolution de l'apparition des foyers au cours du temps. (C) Fréquence relative du nombre de foyers par cellule.

Comme présenté dans la figure 36a, on observe des foyers bien localisés à l'intérieur de la cellule et sans localisation particulière dans la cellule. La figure 36b présente le nombre moyen de foyers de BrdU dans les cellules en fonction du temps de culture. On observe une apparition rapide du nombre de foyers, environ 1,1 foyer en 30 minutes. Après une légère diminution, le nombre moyen de foyers augmente jusqu'à plus de trois foyers par cellule après 180 minutes de culture en présence de BrdU. La fréquence relative du nombre de foyers (Fig. 36c) nous montre une faible proportion de cellules ne possédant aucun foyer de BrdU après 30 minutes de culture, indiquant que presque toutes les cellules sont en cours de réplication.

La localisation des foyers de BrdU dans la cellule, le nombre moyen de foyers par cellule, ainsi que la fréquence relative du nombre de foyers par cellule sont similaires à ceux obtenus avec la souche $\Delta hts \Delta hdrB$ (HvYCO). On peut donc en conclure que la délétion des origines de réplication ne perturbe pas la localisation cellulaire de l'ADN néosynthétisé.

III] ETUDE DE L'ACTIVATION DES ORIGINES DE REPLICATION A L'ECHELLE DU CHROMOSOME

Les résultats précédents permettent d'étudier la réplication à l'échelle d'une cellule, mais des inconnues persistent concernant le nombre d'origines de réplifications activées dans une cellule, ainsi que sur le nombre de chromosomes utilisés lors de la réplication. Répondre à ces deux questions nous permettrait de savoir combien de fourches de réplication sont présentes dans la cellule, et corrélérer ce nombre avec le nombre de foyers de BrdU détectés en cellule entière pour savoir combien de fourches de réplication sont présentes sous un foyer.

Pour répondre à ces questions, il nous faut nous intéresser aux chromosomes en tant que molécules individuelles, et révéler au sein de ces molécules individuelles l'incorporation de la BrdU pour étudier la dynamique de réplication. C'est pourquoi nous avons souhaité développer chez *H. volcanii* la technique de peignage moléculaire, qui consiste à venir étirer de longs fragments linéaires d'ADN sur une lamelle de verre pour les observer avec un microscope. Cela est réalisé en étroite collaboration avec Kathrin Marheineke et Olivier Haccard, du laboratoire « Dynamique de la Réplication de l'ADN chez les eucaryotes supérieurs » de l'I2BC, Gif-sur-Yvette.

La souche est mise en culture en présence d'un analogue de la thymidine pendant un temps donné, et une fois l'ADN extrait puis étiré, les fibres d'ADN comme la présence de l'analogue sont révélées par

immunodétection. Cela permet de visualiser sur la fibre la proportion d'ADN marqué lors de la culture. Un double marquage de l'ADN par l'incorporation successive de deux analogues différents, généralement IdU puis CldU, permet d'en plus orienter les régions d'ADN néosynthétisées et ainsi révéler le nombre de fourches de réplication, que l'on peut corrélérer au nombre d'origines actives. Cette technique nous permet de travailler sur des molécules d'ADN de très grandes tailles (plusieurs Mb), ce qui permet chez *H. volcanii*, en théorie, d'étudier l'incorporation de la BrdU sur des portions importantes de chromosomes linéarisés, idéalement d'au moins la moitié. L'inconvénient de cette technique est la nécessité d'obtenir des fibres les plus longues possibles.

Pour cela, l'ADN doit être extrait de la manière la plus douce possible : une culture en présence de BrdU est lavée de son milieu de culture pour être resuspendue dans de l'agarose low-melting 0,5%. L'agarose va emprisonner les cellules, et l'ADN va pouvoir être purifié dans l'agarose par lyse de la cellule et digestion des protéines avec la protéinase K. Une fois l'ADN purifié, il va pouvoir être libéré de l'agarose grâce à l'action de la β -agarase I. Une lamelle de verre silanisée, pour permettre à l'ADN de s'attacher, va être plongée dans la suspension d'ADN et remontée lentement (environ 0,4 mm/s) pour que l'ADN puisse être étiré le long de la lamelle. Il est possible de la visualiser dès cette étape en colorant l'ADN étiré avec du YOYO, un intercalant de l'ADN double brin (Fig. 37a). L'ADN doit ensuite être dénaturé grâce à un agent dénaturant (classiquement NaOH ou formamide) pour permettre son immunodétection ainsi que l'immunodétection des analogues. (Fig. 37b).

H.volcanii étant une archée halophile stricte, des lavages préliminaires doivent être ajoutés pour éliminer le sel nécessaire à la croissance d'*H.volcanii* de l'agarose contenant les cellules d'*H. volcanii*. La forte concentration en sel s'est révélée incompatible avec l'utilisation des enzymes, notamment la protéinase K, qui est la première enzyme utilisée, de sorte que très peu de très petites fibres d'ADN étaient obtenues dans ce cas. Par ailleurs, nous avons remarqué que l'ajout d'EDTA dès les premières étapes de la purification de l'ADN améliore la qualité de l'ADN peigné, probablement car les cellules lysent dès qu'elles quittent leur environnement salé lors du premier lavage de sorte que la présence d'EDTA inhibe l'action des DNases ainsi libérées.

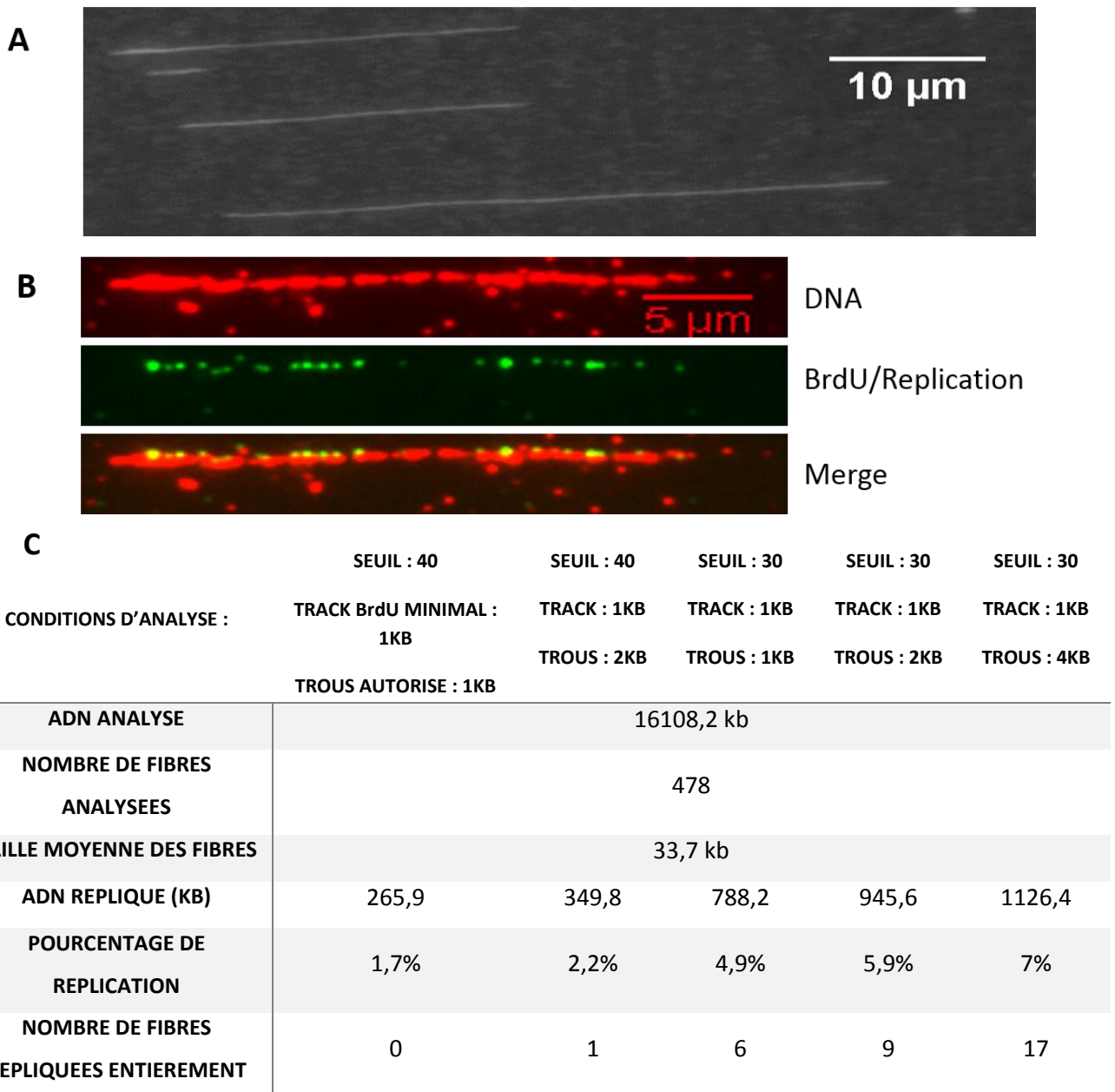


Figure 37 : Résultats préliminaires obtenus avec le peignage moléculaire. (A) Fibres d'ADN peignées et colorées au YOYO. (B) Exemple de fibre marquée avec un anticorps anti BrdU (vert) et anti ADN (rouge). (C) Mesures préliminaires dans les conditions expérimentales actuelles.

Ces modifications nous ont permis d'obtenir des fibres de la souche $\Delta hts \Delta hrdB$ (HvYCO), marquées pendant 30 minutes avec la BrdU et révélées avec un anticorps anti-ADN, d'une taille moyenne d'environ 35 kb (Fig. 37c). Cette taille moyenne a été calculée à partir de 478 fibres. Aucune sélection de taille n'a été faite, et les petits fragments étant majoritaires, ils abaissent considérablement la moyenne des fibres « exploitables ». Avec ce protocole, il est possible d'obtenir en quantité raisonnable des fibres marquées de 100 kb.

Les mesures préliminaires qui peuvent être faites ne peuvent pas permettre d'obtenir des informations représentatives des processus biologiques pour le moment, mais certaines informations peuvent être extraites :

- il est possible de peigner l'ADN issu d'une culture d'*H. volcanii*. Des optimisations du protocole ont permis d'améliorer la longueur des fibres obtenues, d'autres peuvent être envisager pour encore augmenter encore la taille des fragments d'ADN (Kaykov et al. 2016).
- il est possible de détecter la présence de BrdU dans l'ADN peigné, indiquant que l'incorporation de BrdU est suffisamment efficace pour permettre de détecter le signal en molécules uniques.

On constate cependant que l'immunodétection de l'ADN comme du BrdU est discontinue. Cela pose un problème pour connaître la taille des fibres observées et la taille du marquage BrdU, ainsi que pour différencier une absence de signal due à un problème de marquage de celui due à deux fourches de réplication proches. Cela pourrait être amélioré en en optimisant les conditions de dénaturation de l'ADN.

Les paramètres d'analyses sont également très importants et devront être finement déterminés (Fig. 37c). Une analyse quantitative préliminaire des fibres obtenues illustre effectivement le fait que selon les paramètres utilisés (Seuil à partir duquel le signal est comptabilisé, Longueur minimale du track de BrdU à partir duquel il est comptabilisé, Longueur des zones sans signal autorisé à l'intérieur d'un track BrdU), le pourcentage de fibres répliquées varie de 1,7% dans des conditions stringentes (première colonne) avec 0 fibre entièrement répliquée à 7% dans des conditions moins stringentes (dernière colonne) avec 17 fibres entièrement répliquées.

Les résultats obtenus avec cette technique sont encourageants, et chaque modification du protocole a donné lieu à une amélioration dans la longueur des fibres obtenues. D'autres modifications du protocole sont envisagées pour améliorer encore la longueur des fibres (Kaykov et al. 2016), et la mise au point de cette technique est actuellement poursuivie.

IV] SUIVI DE LA REPLICATION AU COURS DU TEMPS

L'étude de la localisation de la protéine de réplication RPA2 a été réalisée sur des cellules vivantes, mais sans suivi dans le temps. Les images analysées correspondaient à une localisation à un instant t. Or il serait intéressant de pouvoir suivre la localisation des foyers GFP::RPA2 dans une même cellule lors de la

prolifération. Ainsi, développer un protocole permettant d'observer des cellules se diviser sous le microscope (*Time lapse*) est la continuité directe de l'étude de la localisation des protéine Hef::GFP (Lestini et al. 2013) et GFP::RPA2 (Delpech et al. 2018) réalisées au laboratoire. Cela permettrait à la fois d'observer plus finement la dynamique des foyers de fluorescence (apparitions, disparitions, mouvements) lors de la prolifération, ainsi que de mesurer la réponse à un stress réplcatif (exposition à l'aphidicoline) au cours du temps.

Pour permettre aux cellules de pousser sous le microscope et d'observer les foyers de fluorescence GFP::RPA2, il faut un microscope à fluorescence équipé d'une chambre d'incubation permettant de maintenir une température de 45°C tout au long de l'expérience. La souche a besoin de son côté d'un milieu de culture semi-solide sur lequel pousser. *H.volcanii* étant halophile, et nécessitant de plus une température de 45°C pour sa croissance, le problème récurrent est la dessiccation du milieu de culture, privant les cellules d'eau et cristallisant le sel. La méthode consistant à sceller le milieu de culture entre deux lamelles de verre (cf. IV] *Time lapse*) correspond à la seule condition, parmi celles testées, permettant de faire pousser des cellules.

A partir d'une culture liquide en début de phase exponentielle de croissance, une goutte de 2 μ l est déposée sur un bloc d'agar 1% contenant du milieu de culture posé sur une première lamelle de verre. Une chambre contenant de l'air est creusée dans le milieu de culture pour permettre un apport d'oxygène, puis la culture est scellée avec une seconde lame de verre. Les cellules sont placées sous le microscope pour être observées, soit grâce à un module DIC (contraste interférentiel différentiel) permettant d'observer les cellules sans marquage, soit sous excitation à 488 nm pour nous permettre de localiser la fusion GFP::RPA2. Dans un premier temps, la mise au point des conditions de culture a été réalisée avec une acquisition automatisée d'images DIC prises toutes les 15 minutes et sur une épaisseur de 40 nm, avec un intervalle Δz de 1 nm entre chaque image. L'acquisition d'une image avec une excitation à 488 nm pourra également être ajoutée dans un second temps.

Les cultures réalisées avec la souche *gfp::rpa2* (HvRL118) dans ces conditions (sans excitation à 488 nm) montrent un temps de génération normal (2h) et permettent des divisions pendant les 16h de culture testées (Fig 38b-2).

Les premières images de la souche *gfp::rpa2* (HvRL118) en essayant de localiser RPA2 posent deux problèmes.

Premièrement, lors de l'acquisition d'images en illuminant la culture à 488 nm, en utilisant un microscope confocal, on observe une mort des cellules dès les premières heures d'imagerie. La longueur d'onde d'excitation à 488 nm présente donc un effet phototoxique probablement lié à la création de dimères de thymine au niveau de l'ADN. L'utilisation d'un microscope à champ large permet de réduire l'effet cytotoxique, mais entraîne néanmoins un retard de croissance important. Dans les conditions expérimentales actuelles, on observe un décalage en z important au début de l'acquisition (14 μ m en 15 min). De telles

valeurs de décalage nous obligent à sur-échantillonner les cellules (donc de les sur-exposer) afin de couvrir la plage parcourue par l'échantillon lors de l'acquisition. Ce décalage peut être réduit avec un préchauffage des échantillons de 30 min avant l'acquisition, le réduisant ainsi à quelques μm sur l'ensemble de l'expérimentation. De nouveaux tests de croissance des cellules avec illumination à 488 nm doivent être faits dans ces conditions. Des tests de suivi du plan focal en utilisant le logiciel du microscope ne se sont pas montrés concluants due à la faible intensité du signal collecté.

Deuxièmement, le milieu de culture YPC possède une autofluorescence qui masque tout signal des cellules à cette longueur d'onde. Une alternative est possible en utilisant le milieu casa, qui est un milieu moins riche que le YPC car il ne contient pas d'extrait de levure. Le temps de génération sur ce milieu (Fig. 38b) et la taille des cellules ont été mesurés et comparés aux cellules ayant poussé sur du milieu de culture YPC, ne révélant aucune différence significative (Fig. 38c). Il faut donc utiliser le milieu casa pour le suivi de fluorescence au cours du temps sous microscope.

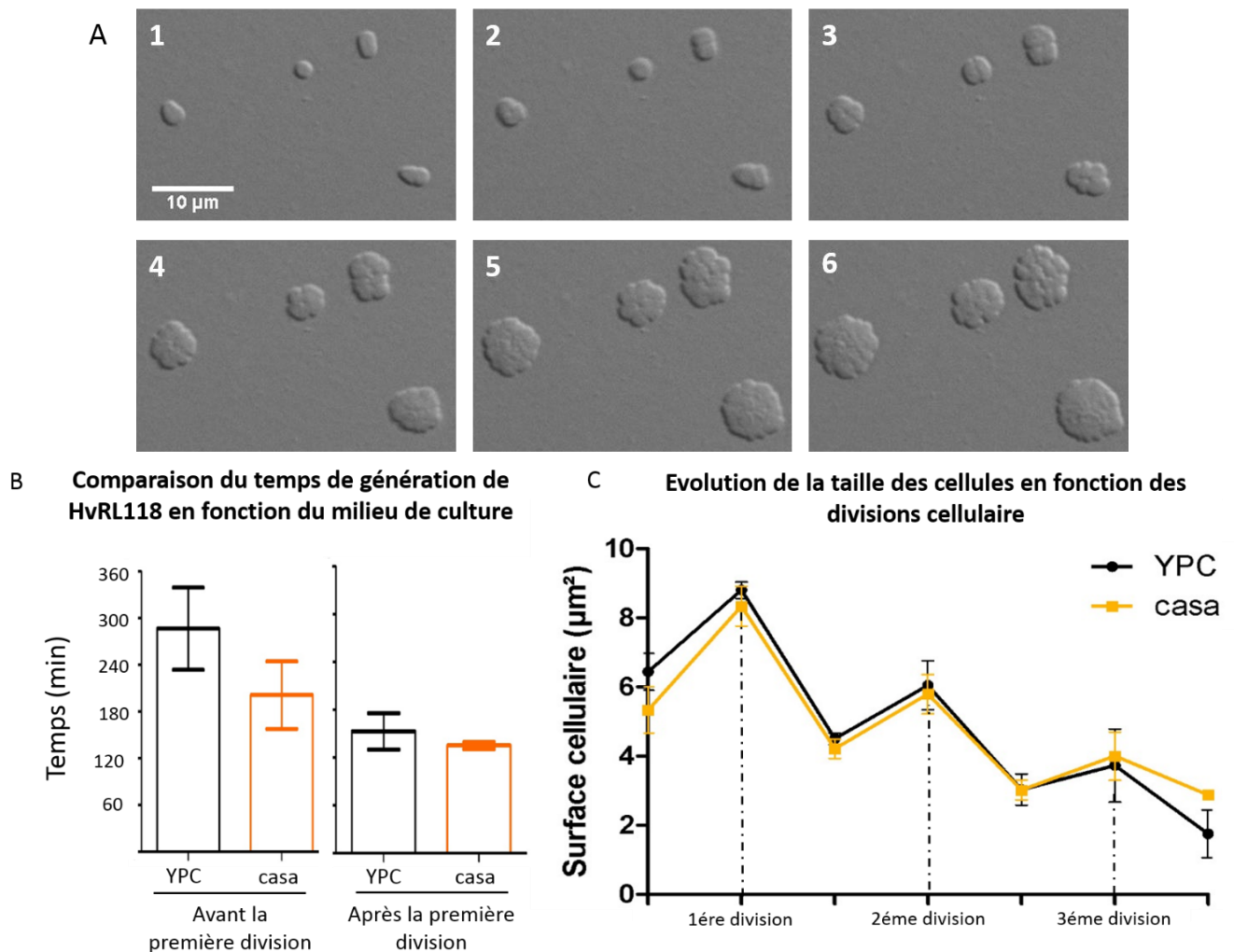


Figure 38 : Résultats préliminaires obtenus avec le *Time lapse*. (A) *Time lapse* de la souche *gfp::rpa2* (HvRL118). L'intervalle de temps entre chaque photo est de 2h30 min. (B) Temps de génération en fonction du milieu de culture. (C) Taille des cellules en fonction du nombre de division.

Bien que cette technique soit encore en développement, plusieurs observations et mesures peuvent déjà être faites pour guider l'exploitation des résultats :

- Le temps de latence avant la première division est très variable (Fig. 38b-1), mais se stabilise autour de deux heures pour les suivantes (Fig. 38b-2), ce qui correspond au temps de latence puis à un rythme normal de division. Il sera important pour les analyses de différencier ces deux cas.
- Les cellules ont tendance à rester en amas serré, rendant leur délimitation compliquée au-delà de la troisième division (Fig. 38a). Un pourcentage plus bas d'agar pourrait être envisagé.
- La surface des cellules peut être mesurée. C'est un paramètre important dans des conditions de stress, notamment pour les expériences utilisant de l'aphidicoline qui entraîne une augmentation de la surface cellulaire. On peut ainsi caractériser la taille des cellules avant et après division. Fait intéressant, dans ces conditions expérimentales, les cellules sont de plus en plus petites au fur et à mesure des divisions (Fig. 38c). Ce phénomène n'a pu être mesuré que pendant trois générations (cf. paragraphe précédent). Il est possible que cela soit dû au manque de place à cause de leur tendance à rester en amas.

En conclusion, j'ai pu observer des cellules se diviser dans un milieu de culture adapté à la localisation de la GFP grâce au module DIC d'un microscope à champs large. Des problèmes de phototoxicité lors de la localisation du signal de fluorescence ne permettent pas l'acquisition de données. L'utilisation d'un microscope à fluorescence équipé d'un *spinning disk* est envisagée, ce qui permettrait de réduire l'exposition des cellules (Boudreau et al. 2016).

Discussion et Perspectives

Le maintien de l'information génétique joue un rôle essentiel dans toutes les formes de vie connue. Il passe par les mécanismes de réparation, qui permettent que le message génétique ne soit pas altéré, et par la réplication, qui permet d'assurer une transmission fidèle cette information.

Toutes les cellules étant des descendantes d'un ancêtre commun universel appelé LUCA (Last Universal Common Ancestor), elles ont eu, à partir des mêmes conditions initiales, à évoluer et à trouver les mécanismes les plus performants leur permettant de transmettre l'information génétique. Concernant le mécanisme de réplication, dans le cas d'un LUCA contenant un stockage de l'information sous forme d'ADN, il serait apparu deux fois au cours de l'évolution : une fois chez un ancêtre des bactéries, et une fois chez un ancêtre commun que nous partageons avec les archées, témoignant de l'importance de cette fonction.

De nombreuses études visant à découvrir et mieux comprendre comment ce mécanisme fonctionne ont principalement été menées chez les bactéries et les eucaryotes, dont les modèles sont assez bien connus aujourd'hui. La découverte tardive des archées (comparativement aux bactéries et aux eucaryotes) fait que les mécanismes archéens de la réplication sont moins bien connus. Les premières études les concernant révèlent que ces mécanismes sont semblables à ceux rencontrés chez les eucaryotes, mais en moins complexes, tout en possédant également des particularités qui leurs sont propres.

Le processus de réplication commence à des séquences spécifiques appelées origines de réplication, qui sont reconnues par les protéines régulatrices de la réplication (OBP), menant à leur activation. La majorité des archées découvertes possèdent plusieurs OBPs ainsi que plusieurs origines de réplication sur leur chromosome circulaire. Toutes les origines de réplication ne sont pas nécessairement activées à chaque cycle d'initiation, suggérant qu'une régulation complexe de l'initiation est à l'œuvre.

Nous nous sommes intéressés à la dynamique de la réplication chez l'archée *H. volcanii*. La souche de laboratoire H26 possède quatre origines de réplication sur son chromosome principal (3,5 Mb) ainsi que 16 OBPs. La cellule d'*H. volcanii* contient en moyenne 18 copies du chromosome principal en phase exponentielle de croissance. De plus, toutes les origines de réplication peuvent être supprimées, et la souche résultante Δori (H1804) possède un temps de génération deux fois plus court que la souche sauvage (Hawkins et al. 2013).

Pour étudier la réplication, le laboratoire s'est intéressé à l'étude de la protéine RPA2, seule SSB essentielle chez *H. volcanii* et impliquée dans la réplication et la réparation de l'ADN (Skowrya and MacNeill 2012). Dans

le cadre de la thèse de Floriane Delpech, une version de RPA2 fusionnée à la protéine verte fluorescente (GFP) a été construite et caractérisée. Cela a permis de montrer que la fusion GFP::RPA2 est fonctionnelle, et remplit ses fonctions cellulaires, car la souche mutante exprimant la fusion GFP::RPA2 possède un temps de génération identique à la souche sauvage, et présente une survie cellulaire similaire lors de stress réplicatifs ou de lésion de l'ADN. L'étude de la localisation de RPA2 en cellule vivante montre des foyers de fluorescence bien délimités à l'intérieur de la cellule, sans localisation particulière. On observe une majorité de cellules possédant 2 à 3 foyers de RPA2 au cours de la phase exponentielle de croissance, et ce nombre diminue en phase stationnaire de croissance. L'observation de cellules uniques montre également une variabilité du nombre de foyers de cellule à cellule, et la distribution du nombre de foyers observés par cellule suit une loi de Poisson, suggérant la formation stochastique de foyers de réplication d'une cellule à une autre. Le nombre de copies du chromosome étant directement dépendant du nombre d'initiations, on pourrait s'attendre à observer une grande variabilité du nombre de copies du chromosome d'une cellule à l'autre et d'une génération à l'autre, or le nombre de copies est stable. Cela suggère la présence de mécanismes de régulation du nombre de copies du chromosome indépendant de l'initiation, comme cela a été observé chez les cyanobactéries (Ohbayashi et al. 2019).

Afin d'apporter un outil supplémentaire pour étudier la réplication, j'ai développé une souche capable d'incorporer des analogues de la thymidine pour marquer l'ADN néosynthétisé et étudier sa localisation dans la cellule. Les résultats ainsi obtenus sont similaires à ceux obtenus avec la fusion GFP::RPA2, avec des foyers de fluorescence bien délimités, sans localisation particulière dans la cellule. On observe également 1 à 2 foyers par cellule en début de phase exponentielle de croissance, et ce nombre augmente avec le temps de culture, jusqu'à 4 foyers après 16 heures de culture. Comme pour les foyers de RPA2, on observe une variabilité de cellule à cellule suivant une loi de Poisson. De plus, on observe que 90% des cellules possèdent au moins un foyer de fluorescence, indiquant que la réplication est active dans la majorité des cellules.

L'ensemble de ces résultats indiquent qu'une large majorité des foyers de RPA2 observés correspondent à des zones actives de réplication. Une expérience de colocalisation de l'ADN néosynthétisé et de GFP::RPA2 nous permettrait de distinguer les foyers de RPA2 impliqués dans la réplication de ceux impliqués dans la réparation de l'ADN. Les tests de colocalisation ont été entrepris mais le protocole actuel de localisation de l'ADN néosynthétisé ne permet pas la localisation simultanée de la fusion GFP::RPA2, une optimisation du protocole de détection de l'ADN néosynthétisé étant nécessaire (cf. résultats II]).

Les résultats concernant ces foyers de réplication soulèvent différentes questions :

- Pourquoi le nombre de foyers de réplication est-il variable d'une cellule à l'autre dans des conditions de culture identiques ? Et pourquoi observe-t-on 2 à 3 foyers de réplication par cellule en phase exponentielle

de croissance ? La cellule possède 18 copies du génome dont chacun contient 4 origines de réplication, soit 72 origines potentiellement activables, et le double de fourches de réplication potentielles.

La vitesse de polymérisation de l'ADN polymérase répliquative chez les archées a été estimée à 20 kilobases par minutes chez *P. abyssi* (Myllykallio et al. 2000) et 15 kb/min chez *S. acidocaldarius* (Hjort and Bernander 2001). Le génome d'*H. volcanii* mesurant 3,5 Mb, il faudrait environ 2 heures pour répliquer un chromosome à partir d'une seule origine de réplication, ce qui correspond au temps de génération mesuré dans des conditions optimales de croissance (en milieu riche à 45°C). La cellule possédant 18 copies de son génome, il faudrait en théorie 18 origines actives par cellule (1 par chromosome répliqué) pour permettre aux cellules de maintenir ce nombre de copies au cours des générations, sans compter les deux méga-plasmides pHV3 (438 kb) et pHV1 (85 kb), possédant chacun une origine de réplication. L'observation de 2 à 3 foyers de réplication par cellule semble incompatible avec ces données si le nombre de copie du chromosome ne diminue pas au fur et à mesure des générations. Cela soulève la question de ce que reflètent ces foyers de réplication : correspondent-ils à une fourche de réplication ? À un couple de fourche issue d'une même origine ? À une multitude de fourche de réplication colocalisées ? Ces expériences ne nous permettent pas de savoir combien de fourches de réplication sont présentes dans une cellule, mais l'hypothèse de la présence de plusieurs fourches de réplication sous un foyer de fluorescence permettrait d'expliquer cette observation.

Pour améliorer notre compréhension du nombre de fourches de réplication dans une cellule, il faudrait connaître le nombre d'origines activées sur un chromosome, ainsi que le nombre de chromosomes répliqués à chaque division. Il est possible d'obtenir des informations grâce au peignage moléculaire, qui permet de marquer l'ADN néosynthétisé et d'observer directement les chromosomes au microscope. Il n'est cependant pas possible pour le moment de synchroniser les cellules chez *H. volcanii*, il nous faudra donc travailler avec une population cellulaire asynchrone et extraire des valeurs moyennes au sein d'une population. Cette technique est actuellement en cours de développement et a déjà permis d'observer des fragments d'ADN marqués avec un analogue de la thymidine en assez grand nombre pour être capable d'effectuer des tests statistiques. Au-delà de pouvoir déterminer le nombre d'origines actives sur un chromosome, et d'étudier le nombre de chromosomes répliqués à chaque division, il est également possible avec cette technique de mesurer la vitesse de polymérisation de l'ADN polymérase répliquative chez *H. volcanii*.

- On observe que le nombre de foyers de BrdU augmente avec le temps, jusqu'à 4 foyers après 16 heures de culture : à quoi correspondent ces foyers de BrdU dans ces cellules qui ne sont plus en phase exponentielle de croissance ? Il est important de rappeler que la croissance *over-night* en présence de BrdU

entraîne un ralentissement de la prolifération pouvant refléter un effet limitant de l'incorporation de BrdU dans l'ADN, voire un effet toxique (peut-être lié à la difficulté de répliquer un ADN matrice contenant l'analogue). Une première hypothèse est qu'ils peuvent correspondre à des foyers de réplication, mais dans ce cas pourquoi sont-ils plus nombreux que dans des cellules en phase exponentielle de croissance ? On peut proposer que la synthèse d'ADN se fasse plus lentement qu'en phase exponentielle de croissance à partir d'un nombre d'initiation de réplication équivalent, de sorte qu'il y ait plus de zones actives de la réplication dans ces cellules.

Une seconde hypothèse est que les foyers de BrdU sont stables dans la cellule, et correspondent donc à une accumulation de ces foyers au fur et à mesure des divisions cellulaires. Pour tester cette seconde hypothèse, j'ai effectué une culture en présence de BrdU pendant 30 minutes afin de voir apparaître les premiers foyers, puis j'ai privé la culture de BrdU, afin de suivre le devenir de ces foyers. Il apparaît que ces foyers disparaissent rapidement, la majorité des foyers ayant disparu après une heure de culture. Cela signifie que le marquage BrdU n'est pas une condition suffisante à elle seule pour détecter des foyers en cellule entière, mais nécessite également que l'ADN marqué soit regroupé spatialement, ou suffisamment concentré dans une zone de la cellule, pour pouvoir le localiser. On peut donc émettre l'hypothèse que ces foyers de BrdU soient le reflet d'une conformation particulière qu'adopte l'ADN lorsque la machinerie de réplication est proche qui permet localement de détecter un signal BrdU spécifique. La machinerie de réplication s'éloignant de cette région néosynthétisée, l'ADN perdrait cette conformation, le signal BrdU devenant alors trop faible pour être détecté. Il serait intéressant de mesurer le signal de fluorescence total d'une cellule ayant poussé 30 minutes en présence de BrdU et dans laquelle plusieurs foyers de BrdU sont apparus, et de comparer ce signal à ces cellules 90 minutes plus tard (juste avant leur division, lorsque les foyers ont disparu). Un signal constant indiquerait que l'absence de détection de foyers résulte d'une dilution du signal, tandis qu'une diminution du signal pourrait suggérer l'existence de mécanismes entraînant leur disparition, par exemple *via* des mécanismes de réparation visant à éliminer de l'ADN l'analogue incorporé. Travailler en cellules synchronisées permettrait également de diminuer l'hétérogénéité de la population cellulaire observée pour plus de précision.

- Qu'est-ce qui détermine la position des foyers de réplication ? Les foyers sont-ils formés là où il faut répliquer l'ADN, ou est-ce l'ADN qui est amené aux foyers de réplication ? Ces foyers sont-ils mobiles ou ancrés à une structure cellulaire ? Et enfin, ces foyers sont-ils stables dans le temps à l'échelle d'une division ? Se pose alors la question de la localisation d'un nouveau foyer et dans quels délais. Des foyers fixes favoriseraient l'hypothèse de zones actives de réplication ancrées et fonctionnant selon le modèle d'une pompe à ADN, comme cela est suggéré chez les cellules de mammifère (Leonhardt et al. 2000), alors que des foyers mobiles favoriseraient le modèle de la machinerie de réplication se comportant comme un train sur

des rails, comme observé chez la bactérie *E. coli* (Reyes-Lamothe et al. 2008). Enfin, des foyers de réplication instables dans le temps à l'échelle d'une division cellulaire favoriseraient plutôt l'hypothèse d'une machinerie qui est recrutée là où l'ADN est répliqué. Une fois la réplication terminée, le foyer serait délocalisé vers un autre chromosome et un autre foyer apparaîtrait ailleurs dans la cellule. Contrairement à cette dernière hypothèse, l'observation de foyers stables dans le temps à l'échelle d'une division indiquerait plutôt un ADN recruté dans une zone de la cellule dédiée à la synthèse de l'ADN, les différents chromosomes étant amenés là où la machinerie de réplication est présente.

Pour répondre à ces questions, il est nécessaire de pouvoir observer la réplication au cours du temps au sein d'une même cellule. En effet, les résultats fournis par les expériences précédentes ne donnent des informations qu'à un temps donné de la réplication, sur une population asynchrone de cellules. Observer et suivre des foyers de réplication au sein de cellules uniques lors de la prolifération est possible grâce à l'utilisation de la fusion GFP::RPA2. La mise au point d'un protocole permettant l'imagerie de cellules en prolifération pendant 16 heures est en cours. Pour l'instant, j'ai pu suivre leur prolifération dans un milieu de culture adapté à la localisation de la GFP grâce au module DIC d'un microscope à champs large. Des problèmes de phototoxicité lors de la localisation du signal de fluorescence à cause de l'utilisation de longueur d'ondes basses ne permettent pas l'acquisition de données. L'utilisation d'un microscope à fluorescence équipé d'un *spinning disk* est envisagée, ce qui permettrait de réduire l'exposition des cellules (Boudreau et al. 2016). De plus une meilleure caractérisation des paramètres d'observation est maintenant terminée et permettrait de réduire l'exposition des cellules d'un facteur 10.

- Enfin, les expériences présentées ci-dessus ont été effectuées avec la souche sans origine de réplication *Δori* (H1804), mais aucune différence concernant le nombre de foyers de réplication n'a pu être mise en évidence. Il a été proposé qu'en absence des origines de réplication, la réplication soit initiée à partir d'intermédiaires de recombinaison homologue (Hawkins et al. 2013). L'absence de différence significative du nombre de foyers de réplication en absence des origines de réplication implique que les mécanismes généraux de contrôle de la dynamique de réplication ne sont pas perturbés. Il est possible que des facteurs limitant le nombre de fourches de réplication dans une cellule, indépendamment de l'initiation de la réplication, soient responsables de cette régulation. Les auteurs suggèrent que l'hélicase répliquative MCM, dont la concentration intracellulaire est faible, puisse être ce facteur.

En conclusion générale de ce travail, j'ai montré, grâce au développement de deux outils permettant l'étude de la réplication, que la réplication chez *H. volcanii* s'effectue dans des zones particulières de la cellule, les cellules présentant majoritairement 2 à 3 foyers de réplication. La variabilité de ce nombre de foyers de

réplication de cellule à cellule suit une loi de probabilité discrète et suggère une initiation aléatoire de l'initiation. Cependant, le nombre de copies du chromosome étant constant de cellule à cellule, ces résultats suggèrent l'existence de mécanismes de contrôles du nombre de copies indépendant de l'initiation. Le nombre de foyers observé par cellule est étonnamment bas par rapport à ce qui aurait pu être attendu par rapport aux connaissances préliminaire, cela soulève la question de ce à quoi correspondent exactement ces foyers de réplication. Ces deux points mettent en évidence la présence de mécanismes de régulation de la dynamique de la réplication qui ne sont pas encore connu chez *H. volcanii*. Améliorer notre compréhension de ces mécanismes complexes nous permettrait de mieux les appréhender, ainsi que d'apporter une réponse à d'autres inconnues tel que la régulation de l'initiation indépendante des origines chez la souche sans origine de réplication, ou le rôle précis de régulation des protéines ORC présentes chez *H. volcanii*.

Bibliographie

- Adam, Panagiotis S., Guillaume Borrel, Céline Brochier-Armanet, and Simonetta Gribaldo. 2017. "The Growing Tree of Archaea: New Perspectives on Their Diversity, Evolution and Ecology." *ISME Journal* 11 (11): 2407–25. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.122>.
- Ahmad, S. I., S. H. Kirk, and A. Eisenstark. 2002. "Thymine Metabolism and Thymineless Death in Prokaryotes and Eukaryotes." *Annual Review of Microbiology* 52 (1): 591–625. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.591>.
- Albers, Sonja-Verena, and Benjamin H Meyer. 2011. "The Archaeal Cell Envelope." *Nature Reviews. Microbiology* 9 (6): 414–26. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2576>.
- Albers, Sonja Verena, and Ken F. Jarrell. 2018. "The Archaeillum: An Update on the Unique Archaeal Motility Structure." *Trends in Microbiology* 26 (4): 351–62. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.01.004>.
- Allers, Thorsten, Shahar Barak, Susan Liddell, Kayleigh Wardell, and Moshe Mevarech. 2010. "Improved Strains and Plasmid Vectors for Conditional Overexpression of His-Tagged Proteins in *Haloferax Volcanii*." *Applied and Environmental Microbiology* 76 (6): 1759–69. <https://doi.org/10.1128/AEM.02670-09>.
- Allers, Thorsten, Hien-ping Ngo, Moshe Mevarech, and Robert G Lloyd. 2004. "Development of Additional Selectable Markers for the Halophilic Archaeon." *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2). <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.943>.
- Asai, Tsuneaki, David B. Bates, and T Kogoma. 1994. "DNA Replication Triggered by Double-Stranded Breaks in *E. Coli*: Dependence on Homologous Recombination Functions." *Cell* 78 (6): 1051–61. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.182.doi>.
- Attwater, James, Aniela Wochner, Vitor B. Pinheiro, Alan Coulson, and Philipp Holliger. 2010. "Ice as a Protocellular Medium for RNA Replication." *Nature Communications* 1 (6): 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms1076>.
- Barry, E. R., and S. D. Bell. 2006. "DNA Replication in the Archaea." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70 (4): 876–87. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00029-06>.
- Beattie, Thomas R., and Stephen D. Bell. 2012. "Coordination of Multiple Enzyme Activities by a Single PCNA in Archaeal Okazaki Fragment Maturation." *EMBO Journal* 31 (6): 1556–67. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.12>.
- Berkmen, Melanie B., and Alan D. Grossman. 2006. "Spatial and Temporal Organization of the *Bacillus Subtilis* Replication Cycle." *Molecular Microbiology* 62 (1): 57–71. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05356.x>.
- Berquist, Brian R., Priya DasSarma, and Shiladitya DasSarma. 2007. "Essential and Non-Essential DNA Replication

- Genes in the Model Halophilic Archaeon, Halobacterium Sp. NRC-1." *BMC Genetics* 8: 1–13.
<https://doi.org/10.1186/1471-2156-8-31>.
- Bitan-banin, Gili, Ron Ortenberg, and Moshe Mevarech. 2003. "Development of a Gene Knockout System for the Halophilic Archaeon." *Journal of Bacteriology* 185 (3): 772–78. <https://doi.org/10.1128/JB.185.3.772>.
- Born, Johannes, and Felicitas Pfeifer. 2019. "Improved GFP Variants to Study Gene Expression in Haloarchaea." *Frontiers in Microbiology* 10 (May). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01200>.
- Boudreau, Colton, Tse Luen Wee, Yan Rung Duh, Melissa P. Couto, Kimya H. Ardakani, and Claire M. Brown. 2016. "Excitation Light Dose Engineering to Reduce Photo-Bleaching and Photo-Toxicity." *Scientific Reports* 6: 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep30892>.
- Brett W. Burkhardt, a Lubomira Cubonova, B, D Margaret R. Heider, c Zvi Kelman, B John N. Reeve, and Thomas J. Santangelo. 2017. "The GAN Exonuclease or the Flap Endonuclease Fen1 and RNase HII Are Necessary for Viability of Thermococcus Kodakarensis" 199 (13): 1–8.
- Breuert, Sebastian, Thorsten Allers, Gabi Spohn, and Jörg Soppa. 2006. "Regulated Polyploidy in Halophilic Archaea." *PLoS ONE* 1 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000092>.
- Brochier-Armanet, Céline, Bastien Boussau, Simonetta Gribaldo, and Patrick Forterre. 2008. "Mesophilic Crenarchaeota: Proposal for a Third Archaeal Phylum, the Thaumarchaeota." *Nature Reviews Microbiology* 6 (3): 245–52. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1852>.
- Cannone, Giuseppe, Yuli Xu, Thomas R. Beattie, Stephen D. Bell, and Laura Spagnolo. 2015. "The Architecture of an Okazaki Fragment-Processing Holoenzyme from the Archaeon Sulfolobus Solfataricus." *Biochemical Journal* 465: 239–45. <https://doi.org/10.1042/BJ20141120>.
- Clarke, Andrew, G. John Morris, Fernanda Fonseca, Benjamin J. Murray, Elizabeth Acton, and Hannah C. Price. 2013. "A Low Temperature Limit for Life on Earth." *PLoS ONE* 8 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066207>.
- Coker, James A., Priya DasSarma, Melinda Capes, Tammitia Wallace, Karen McGarrity, Rachael Gessler, Jingfang Liu, et al. 2009. "Multiple Replication Origins of Halobacterium Sp. Strain NRC-1: Properties of the Conserved Orc7-Dependent OriC1." *Journal of Bacteriology* 191 (16): 5253–61. <https://doi.org/10.1128/JB.00210-09>.
- Cortez, Diego, Sophie Quevillon-cheruel, Simonetta Gribaldo, Nicole Desnoues, Patrick Forterre, and Marie-claude Serre. 2010. "Evidence for a Xer / Dif System for Chromosome Resolution in Archaea" 6 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001166>.
- Cvetic, Christin, and Johannes C. Walter. 2005. "Eukaryotic Origins of DNA Replication: Could You Please Be More Specific?" *Seminars in Cell and Developmental Biology* 16 (3): 343–53. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2005.02.009>.
- Delmas, Stéphane, Iain G. Duggin, and Thorsten Allers. 2013. "DNA Damage Induces Nucleoid Compaction via the Mre11-Rad50 Complex in the Archaeon Haloferax Volcanii." *Molecular Microbiology* 87 (1): 168–79.

<https://doi.org/10.1111/mmi.12091>.

- DeLong, Edward F., and Norman R. Pace. 2001. "Environmental Diversity of Bacteria and Archaea." *Systematic Biology* 50 (4): 470–78. <https://doi.org/10.1080/106351501750435040>.
- Delpech, F. 2016. 'Dynamique cellulaire des protéines de la réplication chez l'archée halophile *Haloferax volcanii*', Université Paris-Saclay, PhD Thesis.
- Delpech, Floriane, Yoann Collien, Pierre Mahou, Emmanuel Beaurepaire, Hannu Myllykallio, and Roxane Lestini. 2018. "Snapshots of Archaeal DNA Replication and Repair in Living Cells Using Super-Resolution Imaging." *Nucleic Acids Research* 46 (20): 10757–70. <https://doi.org/10.1093/nar/gky829>.
- Duggin, Iain G., Nelly Dubarry, and Stephen D. Bell. 2011. "Replication Termination and Chromosome Dimer Resolution in the Archaeon *Sulfolobus solfataricus*." *EMBO Journal* 30 (1): 145–53. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.301>.
- Eme, Laura, Anja Spang, Jonathan Lombard, Courtney W. Stairs, and Thijs J.G. Ettema. 2017. "Archaea and the Origin of Eukaryotes." *Nature Reviews Microbiology* 15 (12): 711–23. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.133>.
- Ettema, Thijs J G, Ann Christin Lindås, and Rolf Bernander. 2011. "An Actin-Based Cytoskeleton in Archaea." *Molecular Microbiology* 80 (4): 1052–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07635.x>.
- Forterre, P., C. Elie, and M. Kohiyama. 1984. "Aphidicolin Inhibits Growth and DNA Synthesis in Halophilic Archaeobacteria." *Journal of Bacteriology* 159 (2): 800–802.
- Forterre, Patrick. 2015. "The Universal Tree of Life: An Update." *Frontiers in Microbiology* 6 (JUN): 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00717>.
- Gehring, Alexandra M., David P. Astling, Rie Matsumi, Brett W. Burkhardt, Zvi Kelman, John N. Reeve, Kenneth L. Jones, and Thomas J. Santangelo. 2017. "Genome Replication in *Thermococcus kodakarensis* Independent of Cdc6 and an Origin of Replication." *Frontiers in Microbiology* 8 (OCT): 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02084>.
- Gilles Boeuf. 2014. *La Biodiversité, de l'océan à La Cité*. Edited by Les comptes rendus. [Http://Journals.Openedition.Org/Lectures](http://Journals.Openedition.Org/Lectures). CNDP-CRDP. <http://journals.openedition.org/lectures/15232>.
- Gottlieb, K., V. Wachter, J. Sliman, and M. Pimentel. 2016. "Review Article: Inhibition of Methanogenic Archaea by Statins as a Targeted Management Strategy for Constipation and Related Disorders." *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 43 (2): 197–212. <https://doi.org/10.1111/apt.13469>.
- Greenough, Lucia, Zvi Kelman, and Andrew F. Gardner. 2015. "The Roles of Family B and D DNA Polymerases in *Thermococcus* Species 9°N Okazaki Fragment Maturation." *Journal of Biological Chemistry* 290 (20): 12514–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.638130>.
- Gristwood, Tamzin, Iain G. Duggin, Michaela Wagner, Sonja V. Albers, and Stephen D. Bell. 2012. "The Sub-Cellular Localization of *Sulfolobus* DNA Replication." *Nucleic Acids Research* 40 (12): 5487–96. <https://doi.org/10.1093/nar/gks217>.

- Gustafsson, M G L. 2000. "Surpassing the Lateral Resolution Limit by a Factor of Two Using Structured Illumination Microscopy." *Journal of Microscopy* 198 (May): 82–87.
- Hartman, Amber L., Cédric Norais, Jonathan H. Badger, Stéphane Delmas, Sam Haldenby, Ramana Madupu, Jeffrey Robinson, et al. 2010. "The Complete Genome Sequence of Haloferax Volcanii DS2, a Model Archaeon." *PLoS ONE* 5 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009605>.
- Hawkins, Michelle, Sunir Malla, Martin J Blythe, Conrad A Nieduszynski, and Thorsten Allers. 2013. "Accelerated Growth in the Absence of DNA Replication Origins." *Nature* 503 (7477): 544–47. <https://doi.org/10.1038/nature12650>.Accelerated.
- Hell, Stefan W., and Jan Wichmann. 1994. "Breaking the Diffraction Resolution Limit by Stimulated Emission: Stimulated-Emission-Depletion Fluorescence Microscopy." *Optics Letters* 19 (11): 780. <https://doi.org/10.1364/ol.19.000780>.
- Henneke, Ghislaine. 2012. "In Vitro Reconstitution of RNA Primer Removal in Archaea Reveals the Existence of Two Pathways." *Biochemical Journal* 447 (2): 271–80. <https://doi.org/10.1042/BJ20120959>.
- Henneke, Ghislaine, Didier Flament, Ulrich Hübscher, Joël Querellou, and Jean Paul Raffin. 2005. "The Hyperthermophilic Euryarchaeota Pyrococcus Abyssii Likely Requires the Two DNA Polymerases D and B for DNA Replication." *Journal of Molecular Biology* 350 (1): 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.04.042>.
- Hjort, K., and R. Bernander. 2001. "Cell Cycle Regulation in the Hyperthermophilic Crenarchaeon Sulfolobus Acidocaldarius." *Molecular Microbiology* 40 (1): 225–34. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02377.x>.
- Hogrel, Gaëlle, Yang Lu, Sébastien Laurent, Etienne Henry, Clarisse Etienne, Duy Khanh Phung, Rémi Dulermo, et al. 2018. "Physical and Functional Interplay between PCNA DNA Clamp and Mre11-Rad50 Complex from the Archaeon Pyrococcus Furiosus." *Nucleic Acids Research* 46 (11): 5651–63. <https://doi.org/10.1093/nar/gky322>.
- Hug, Laura A., Brett J. Baker, Karthik Anantharaman, Christopher T. Brown, Alexander J. Probst, Cindy J. Castelle, Cristina N. Butterfield, et al. 2016. "A New View of the Tree of Life." *Nature Microbiology* 1 (5): 1–6. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48>.
- Ishino, Yoshizumi, and Sonoko Ishino. 2012. "Rapid Progress of DNA Replication Studies in Archaea, the Third Domain of Life." *Science China Life Sciences* 55 (5): 386–403. <https://doi.org/10.1007/s11427-012-4324-9>.
- Iwai, Toshie, Norio Kurosawa, Yuko H. Itoh, Naohiro Kimura, and Tadao Horiuchi. 2000. "Sequence Analysis of Three Family B DNA Polymerases from the Thermoacidophilic Crenarchaeon Sulfurisphaera Ohwakuensis." *DNA Research* 7 (4): 243–51. <https://doi.org/10.1093/dnares/7.4.243>.
- Jensen, Rasmus B., Sherry C. Wang, and Lucy Shapiro. 2001. "A Moving DNA Replication Factory in Caulobacter Crescentus." *EMBO Journal* 20 (17): 4952–63. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4952>.
- Kaykov, Atanas, Thibaud Taillefumier, Aaron Bensimon, and Paul Nurse. 2016. "Molecular Combing of Single DNA Molecules on the 10 Megabase Scale." *Scientific Reports* 6: 80–84. <https://doi.org/10.1038/srep19636>.

- Kelman, Lori M., and Zvi Kelman. 2014. "Archaeal DNA Replication." *Annual Review of Genetics* 48 (1): 71–97. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120213-092148>.
- Kennedy, Brian K, David A Barbie, Marie Classon, Nicholas Dyson, and Ed Harlow. 2000. "Nuclear Organization of DNA Replication in Primary Mammalian Cells," 2855–68. <https://doi.org/10.1101/gad.842600.regulated>.
- Koberna, Karel, Anna Ligasová, Jan Malínský, Artem Pliss, Alan J. Siegel, Zuzana Cvačková, Helena Fidlerová, et al. 2005. "Electron Microscopy of DNA Replication in 3-D: Evidence for Similar-Sized Replication Foci throughout S-Phase." *Journal of Cellular Biochemistry* 94 (1): 126–38. <https://doi.org/10.1002/jcb.20300>.
- Kushida, Takashi, Issay Narumi, Sonoko Ishino, Yoshizumi Ishino, Shinsuke Fujiwara, Tadayuki Imanaka, and Hiroki Higashibata. 2019. "Pol B, a Family B DNA Polymerase, in *Thermococcus Kodakarensis* Is Important for DNA Repair, but Not DNA Replication." *Microbes and Environments* 34 (3): 316–26. <https://doi.org/10.1264/jsme2.me19075>.
- Lange, Christian, Karolin Zerulla, Sebastian Breuert, and Jörg Soppa. 2011. "Gene Conversion Results in the Equalization of Genome Copies in the Polyploid Haloarchaeon *Haloferax Volcanii*." *Molecular Microbiology* 80 (3): 666–77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07600.x>.
- Lao-Sirieix, Si Houy, and Stephen D. Bell. 2004. "The Heterodimeric Primase of the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus Solfataricus* Possesses DNA and RNA Primase, Polymerase and 3'-Terminal Nucleotidyl Transferase Activities." *Journal of Molecular Biology* 344 (5): 1251–63. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.10.018>.
- Leonhardt, Heinrich, Hans-peter Rahn, Peter Weinzierl, Anje Sporbert, Thomas Cremer, Daniele Zink, and M Cristina Cardoso. 2000. "Dynamics of DNA Replication Factories in Living Cells" 149 (2): 271–79.
- Lestini, Roxane, Floriane Delpech, and Hannu Myllykallio. 2015. "DNA Replication Restart in Archaea." In *Advances in DNA Repair*, i:13. InTech. <https://doi.org/10.5772/59994>.
- Lestini, Roxane, Sergey P. Laptinok, Joëlle Kühn, Mark A. Hink, Marie Claire Schanne-Klein, Ursula Lieb, and Hannu Myllykallio. 2013. "Intracellular Dynamics of Archaeal FANCM Homologue Hef in Response to Halted DNA Replication." *Nucleic Acids Research* 41 (22): 10358–70. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt816>.
- Li, Mamie Z., and Stephen J. Elledge. 2007. "Harnessing Homologous Recombination in Vitro to Generate Recombinant DNA via SLIC." *Nature Methods* 4 (3): 251–56. <https://doi.org/10.1038/nmeth1010>.
- Liu, Yuchen, and William B. Whitman. 2008. "Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125: 171–89. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.019>.
- Ludt, Katharina, and Jörg Soppa. 2018. "Influence of Origin Recognition Complex Proteins on the Copy Numbers of Three Chromosomes in *Haloferax Volcanii*." Edited by Anke Becker. *Journal of Bacteriology* 200 (17): 1–13. <https://doi.org/10.1128/JB.00161-18>.
- Lurie-Weinberger, Mor N., and Uri Gophna. 2015. "Archaea in and on the Human Body: Health Implications and Future Directions." *PLOS Pathogens* 11 (6): e1004833. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004833>.

- Magdalou, Indiana, Bernard S. Lopez, Philippe Pasero, and Sarah A.E. Lambert. 2014. "The Causes of Replication Stress and Their Consequences on Genome Stability and Cell Fate." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 30: 154–64. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.04.035>.
- Mariko Nagata¹, Sonoko Ishino^{1,*}, Takeshi Yamagami¹, Hiromi Ogino¹, Jan-Robert Simons², Tamotsu Kanai², Haruyuki Atomi² and Yoshizumi Ishino¹. 2017. "The Cdc45 / RecJ-like Protein Forms a Complex with GINS and MCM , and Is Important for DNA Replication in *Thermococcus Kodakarensis*" 45 (18): 10693–705. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx740>.
- Matsunaga, Fujihiko, Patrick Forterre, Yoshizumi Ishino, and Hannu Myllykallio. 2001. "In Vivo Interactions of Archaeal Cdc6/Orc1 and Minichromosome Maintenance Proteins with the Replication Origin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (20): 11152–57. <https://doi.org/10.1073/pnas.191387498>.
- Matsunaga, Fujihiko, Annie Glatigny, Marie Hélène Mucchielli-Giorgi, Nicolas Agier, Hervé Delacroix, Laetitia Marisa, Patrice Durosay, Yoshizumi Ishino, Lawrence Aggerbeck, and Patrick Forterre. 2007. "Genomewide and Biochemical Analyses of DNA-Binding Activity of Cdc6/Orc1 and Mcm Proteins in *Pyrococcus Sp.*" *Nucleic Acids Research* 35 (10): 3214–22. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm212>.
- Moissl-Eichinger, Christine, Manuela Pausan, Julian Taffner, Gabriele Berg, Corinna Bang, and Ruth A. Schmitz. 2018. "Archaea Are Interactive Components of Complex Microbiomes." *Trends in Microbiology* 26 (1): 70–85. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.004>.
- Mullakhanbhai, Moiz F., and Helge Larsen. 1975. "Halobacterium Volcanii Spec. Nov., a Dead Sea Halobacterium with a Moderate Salt Requirement." *Archives of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/BF00447326>.
- Müller-Taubenberger, Annette, and Kurt I. Anderson. 2007. "Recent Advances Using Green and Red Fluorescent Protein Variants." *Applied Microbiology and Biotechnology* 77 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1131-5>.
- Müller, Carolin A., Michael A. Boemo, Paolo Spingardi, Benedikt M. Kessler, Skirmantas Kriaucionis, Jared T. Simpson, and Conrad A. Nieduszynski. 2019. "Capturing the Dynamics of Genome Replication on Individual Ultra-Long Nanopore Sequence Reads." *Nature Methods* 16 (5): 429–36. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0394-y>.
- Myllykallio, Hannu, Lopez, Lopez-Garcia, Heilig, Philippe, Yvan Zivanovic, and Patrick Forterre. 2000. "Bacterial Mode of Replication with Eukaryotic-Like Machinery in a Hyperthermophilic Archaeon." *Science* 288 (June): 2212–15.
- Myllykallio, Hannu, Pierre Sournia, Alice Heliou, and Ursula Liebl. 2018. "Unique Features and Anti-Microbial Targeting of Folate- and Flavin-Dependent Methyltransferases Required for Accurate Maintenance of Genetic Information." *Frontiers in Microbiology* 9 (MAY): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00918>.
- Neef, A. B., and N. W. Luedtke. 2011. "Dynamic Metabolic Labeling of DNA in Vivo with Arabinosyl Nucleosides." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (51): 20404–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101126108>.
- Norais, Cédric, Michelle Hawkins, Amber L. Hartman, Jonathan A. Eisen, Hannu Myllykallio, and Thorsten Allers. 2007.

“Genetic and Physical Mapping of DNA Replication Origins in *Haloferax Volcanii*.” *PLoS Genetics* 3 (5): 729–43.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030077>.

O’Donnell, Michael, Lance Langston, and Bruce Stillman. 2013. “Principles and Concepts of DNA Replication in Bacteria, Archaea, and Eukarya.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (7): 1–13.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010108>.

Ohbayashi, Ryudo, Ai Nakamachi, Tetsuhiro S. Hatakeyama, Satoru Watanabe, Yu Kanesaki, Taku Chibazakura, Hirofumi Yoshikawa, and Shin Ya Miyagishima. 2019. “Coordination of Polyploid Chromosome Replication with Cell Size and Growth in a Cyanobacterium.” *MBio* 10 (2): 1–15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00510-19>.

Ortenberg, Ron, Orit Rozenblatt-Rosen, and Moshe Mevarech. 2000. “The Extremely Halophilic Archaeon *Haloferax Volcanii* Has Two Very Different Dihydrofolate Reductases.” *Molecular Microbiology* 35 (6): 1493–1505.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01815.x>.

Patrick Forterre, Jonathan Filée, and Hannu Myllykallio. 2004. *Origin and Evolution of DNA and DNA Replication Machineries*. *Madame Curie Bioscience Database*. Landes Bio. Vol. 0. Madame Curie Bioscience Database.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6360/>.

Paula A. Agudelo Garcia, Miranda Gardner, Michael A. Freitas, and Mark R. Parthun. 2019. “Isolation of Proteins on Nascent Chromatin and Characterization by Quantitative Mass Spectrometry.” *Methods in Molecular Biology* 1983: 237–53. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9434-2>.

Pfeiffer, F., S. C. Schuster, A. Broicher, M. Falb, P. Palm, K. Rodewald, A. Ruepp, J. Soppa, J. Tittor, and D. Oesterhelt. 2008. “Evolution in the Laboratory: The Genome of *Halobacterium Salinarum* Strain R1 Compared to That of Strain NRC-1.” *Genomics* 91 (4): 335–46. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.01.001>.

Pham, Tuan Minh, Kang Wei Tan, Yuichi Sakumura, Katsuzumi Okumura, Hisaji Maki, and Masahiro Tatsumi Akiyama. 2013. “A Single-Molecule Approach to DNA Replication in *Escherichia Coli* Cells Demonstrated That DNA Polymerase III Is a Major Determinant of Fork Speed.” *Molecular Microbiology* 90 (3): 584–96.
<https://doi.org/10.1111/mmi.12386>.

Rawlings, Douglas E., and D. Barrie Johnson. 2007. “The Microbiology of Biomining: Development and Optimization of Mineral-Oxidizing Microbial Consortia.” *Microbiology* 153 (2): 315–24.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/001206-0>.

Raymann, Kasie, Patrick Forterre, Céline Brochier-Armanet, and Simonetta Gribaldo. 2014. “Global Phylogenomic Analysis Disentangles the Complex Evolutionary History of DNA Replication in Archaea.” *Genome Biology and Evolution* 6 (1): 192–212. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu004>.

Reuter, Christopher J., and Julie A. Maupin-Furlow. 2004. “Analysis of Proteasome-Dependent Proteolysis in *Haloferax Volcanii* Cells, Using Short-Lived Green Fluorescent Proteins.” *Applied and Environmental Microbiology* 70 (12): 7530–38. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7530-7538.2004>.

Reyes-Lamothe, Rodrigo, Emilien Nicolas, and David J. Sherratt. 2012. “Chromosome Replication and Segregation in

- Bacteria." *Annual Review of Genetics* 46 (1): 121–43. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155421>.
- Reyes-Lamothe, Rodrigo, Christophe Possoz, Olessia Danilova, and David J. Sherratt. 2008. "Independent Positioning and Action of Escherichia Coli Replisomes in Live Cells." *Cell* 133 (1): 90–102. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.044>.
- Reyes-lamothe, Rodrigo, David J Sherratt, and Mark C Leake. 2010. "Stoichiometry and Architecture of Active DNA Replication Machinery in Escherichia Coli." *Science* 328 (5977): 498–501. <https://doi.org/10.1126/science.1185757.Stoichiometry>.
- Ro Y. Stainer and C.B. Van Niel. 1962. "The Concept of a Bacterium." *Archiv Für Mikrobiologie* 42 (1): 17–35. <https://doi.org/10.1007/BF00425185>.
- Robinson, N. P., and S. D. Bell. 2007. "Extrachromosomal Element Capture and the Evolution of Multiple Replication Origins in Archaeal Chromosomes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (14): 5806–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700206104>.
- Rothschild, L J, and R L Mancinelli. 2011. "Life in Extreme Environments (Nature).PDF." *Nature* 409 (6823): 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/35059215>.
- Rouillon, Christophe, Ghislaine Henneke, Didier Flament, Joël Querellou, and Jean Paul Raffin. 2007. "DNA Polymerase Switching on Homotrimeric PCNA at the Replication Fork of the Euryarchaea *Pyrococcus Abyssii*." *Journal of Molecular Biology* 369 (2): 343–55. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.03.054>.
- Ruggiero, Michael A., Dennis P. Gordon, Thomas M. Orrell, Nicolas Bailly, Thierry Bourgoïn, Richard C. Brusca, Thomas Cavalier-Smith, Michael D. Guiry, and Paul M. Kirk. 2015. "A Higher Level Classification of All Living Organisms." *PLoS ONE* 10 (4): 1–60. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119248>.
- Rust, Michael J., Mark Bates, and Xiaowei Zhuang. 2006. "Sub-Diffraction-Limit Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM)." *Nature Methods* 3 (10): 793–95. <https://doi.org/10.1038/nmeth929>.
- Samson, Rachel Y., and Stephen D. Bell. 2016. "Mechanism of Archaeal MCM Helicase Recruitment to DNA Replication Origins." *Molecular Cell* 61 (2): 287–96. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.12.005>.
- Samson, Rachel Y., T. Obita, S. M. Freund, R. L. Williams, and Stephen D. Bell. 2008. "A Role for the ESCRT System in Cell Division in Archaea." *Science* 322 (5908): 1710–13. <https://doi.org/10.1126/science.1165322>.
- Samson, Rachel Y., Yanqun Xu, Catarina Gadelha, Todd A. Stone, Jamal N. Faqiri, Dongfang Li, Nan Qin, et al. 2013. "Specificity and Function of Archaeal DNA Replication Initiator Proteins." *Cell Reports* 3 (2): 485–96. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.01.002>.
- Skowyra, Agnieszka, and Stuart A. MacNeill. 2012. "Identification of Essential and Non-Essential Single-Stranded DNA-Binding Proteins in a Model Archaeal Organism." *Nucleic Acids Research* 40 (3): 1077–90. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr838>.
- Spang, Anja, Jimmy H Saw, Steffen L Jørgensen, Katarzyna Zaremba-Niedzwiedzka, Joran Martijn, Anders E Lind, Roel

- van Eijk, et al. 2015. "Europe PMC Funders Group Complex Archaea That Bridge the Gap between Prokaryotes and Eukaryotes." *Nature* 521 (7551): 173–79. <https://doi.org/10.1038/nature14447>.Complex.
- Stachler, Aris Edda, Thandi Sarah Schwarz, Sandra Schreiber, and Anita Marchfelder. 2019. "CRISPRi as an Efficient Tool for Gene Repression in Archaea." *Methods*, no. March: 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.05.023>.
- Stork, Nigel E. 2010. "Re-Assessing Current Extinction Rates." *Biodiversity and Conservation* 19 (2): 357–71. <https://doi.org/10.1007/s10531-009-9761-9>.
- Sullivan, Kevin Francis, Steve A. Kay, and American Society for Cell Biology. 1999. *Green Fluorescent Proteins*. Academic Press. https://books.google.fr/books?id=nN9M0DjsE7cC&pg=PA176&lpg=PA176&dq=formamide+et+GFP&source=bl&ots=wjx8VFAR_H&sig=ACfU3U2QR6r0pNFrk4gpe1YLTrPUofzXOw&hl=fr&sa=X&ved=2ahUKewj15YPTmMnjAhVp5OAKHdGwAXAQ6AEwDnoECAgQAQ#v=onepage&q=formamide+et+GFP&f=false.
- Suzuki, Shoji, and Norio Kurosawa. 2019. "Robust Growth of Archaeal Cells Lacking a Canonical Single-Stranded DNA-Binding Protein," no. June: 1–6. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz124>.
- Thayne H. Dickey¹, Sarah E. Altschuler^{1, 2}, and Deborah S. Wuttke¹. 2008. "Single-Stranded DNA-Binding Proteins: Multiple Domains for Multiple Functions." *Bone* 23 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.
- Tsien, R Y. 1998. "The Green Fluorescent Protein." *Annual Review of Biochemistry* 67: 509–44. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>.
- Tuduri, Sandie, Hélène Tourrière, and Philippe Pasero. 2010. "Defining Replication Origin Efficiency Using DNA Fiber Assays." *Chromosome Research* 18 (1): 91–102. <https://doi.org/10.1007/s10577-009-9098-y>.
- Winter, Jody A., and Karen A. Bunting. 2012. "Rings in the Extreme: PCNA Interactions and Adaptations in the Archaea." *Archaea* 2012 (Idcl): 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/951010>.
- Winter, Jody A., Panayiotis Christofi, Shaun Morroll, and Karen A. Bunting. 2009. "The Crystal Structure of Haloferax Volcanii Proliferating Cell Nuclear Antigen Reveals Unique Surface Charge Characteristics Due to Halophilic Adaptation." *BMC Structural Biology* 9: 1–15. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-9-55>.
- Woese, C. R., and G. E. Fox. 1977. "Phylogenetic Structure of the Prokaryotic Domain: The Primary Kingdoms." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (11): 5088–90. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>.
- Woese, C R, O Kandler, and M L Wheelis. 1990. "Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (12): 4576–79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2112744><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PM54159>.
- Woods, Wayne G., and Michael L. Dyll-Smith. 1997. "Construction and Analysis of a Recombination-Deficient (RadA) Mutant of Haloferax Volcanii." *Molecular Microbiology* 23 (4): 791–97. <https://doi.org/10.1046/j.1365->

2958.1997.2651626.x.

- Wu, Zhenfang, Hailong Liu, Jingfang Liu, Xiaoqing Liu, and Hua Xiang. 2012. "Diversity and Evolution of Multiple Orc/Cdc6-Adjacent Replication Origins in Haloarchaea." *BMC Genomics* 13 (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-478>.
- Wu, Zhenfang, Jingfang Liu, Haibo Yang, Hailong Liu, and Hua Xiang. 2014. "Multiple Replication Origins with Diverse Control Mechanisms in Haloarcula Hispanica." *Nucleic Acids Research* 42 (4): 2282–94. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1214>.
- Yang, Haibo, Zhenfang Wu, Jingfang Liu, Xiaoqing Liu, Lei Wang, Shuangfeng Cai, and Hua Xiang. 2015. "Activation of a Dormant Replication Origin Is Essential for Haloferax Mediterranei Lacking the Primary Origins." *Nature Communications* 6: 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms9321>.
- Yao, Nina Y., and Mike E. O'Donnell. 2016. "Evolution of Replication Machines." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 51 (3): 135–49. <https://doi.org/10.3109/10409238.2015.1125845>.
- Yutin, Natalya, and Eugene V. Koonin. 2012. "Archaeal Origin of Tubulin." *Biology Direct* 7 (1): 10. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-7-10>.
- Zatopek, Kelly M., Andrew F. Gardner, and Zvi Kelman. 2018. "Archaeal DNA Replication and Repair: New Genetic, Biophysical and Molecular Tools for Discovering and Characterizing Enzymes, Pathways and Mechanisms." *FEMS Microbiology Reviews* 42 (4): 477–88. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy017>.
- Zuckerandl, Emile, and Linus Pauling. 1965. "Molecules as Documents of History." *Journal of Theoretical Biology* 8: 357–66.

Titre : Dynamique de la réplication chez l'archée *Haloferax volcanii*

Mots clés : Réplication, Archées, *Haloferax volcanii*, Marquage de l'ADN néosynthétisé, Microscopie à fluorescence.

Haloferax volcanii est une archée appartenant au phylum euryarchaeota et à la classe des Halobacteriales. Les mécanismes liés à la réplication et à la réparation chez les archées sont très similaires à ceux rencontrés chez les eucaryotes, faisant d'*H. volcanii* un des organismes modèle pour l'étude de la réplication et de la biologie des archées, notamment car de nombreux outils génétiques sont disponibles chez cet organisme. De plus, *H. volcanii* possède la particularité de pouvoir avoir toutes ses origines de réplication supprimées, soulevant beaucoup de questions sur les mécanismes impliqués. Plusieurs hypothèses ont été émises sur la façon dont cette souche initie sa réplication, basées soit sur la dérivation des mécanismes liés à la réparation de l'ADN, soit sur un mécanisme d'initiation de la réplication indépendant des origines. Afin d'étudier ces mécanismes liés à la réplication, j'ai construit une souche d'*H. volcanii* capable d'incorporer des analogues de la thymidine dans l'ADN lors de sa synthèse grâce à la délétion de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la thymidine. Des temps de cultures courts de la souche en présence d'un analogue permet son incorporation au niveau des zones actives de réplication pour marquer spécifiquement l'ADN néosynthétisé. L'immunodétection de l'analogue incorporé à l'ADN, en travaillant en cellule entière avec un

microscope à fluorescence, permet la localisation de l'ADN néosynthétisé, reflétant ainsi les régions où la réplication est active. Ces analyses révèlent majoritairement 2 à 3 régions de réplication actives dans des cellules en prolifération, sans localisation particulière. Ces régions ont déjà été observées en étudiant la localisation d'une protéine clé de la réplication (RPA2) fusionnée à la protéine verte fluorescente GFP, confirmant sa localisation aux zones actives de réplication. Une étonnante variabilité observée d'une cellule à l'autre et suggère une initiation probabiliste de la réplication. Il est également étonnant de n'observer qu'aussi peu de zones actives de réplication, comparé au fort taux de polyploïdie de cette souche. Se pose alors la question de ce à quoi correspondent ces zones de réplication. Pour cela, j'ai développé chez *H. volcanii* la technique de peignage moléculaire permettant d'isoler des molécules individuelles d'ADN et révéler spécifiquement les analogues incorporés pour pouvoir déterminer le nombre de copies du chromosome qui sont actives lors de la réplication, ainsi que le nombre d'origines actives sur chacune des copies. J'ai également développé une technique de Time-lapse dans le but de suivre ces régions au cours du temps en observant les divisions cellulaires directement sous le microscope.

Title: Replication dynamics in the haloarchaeon *Haloferax volcanii*

Keywords: Replication, Archaea, *Haloferax volcanii*, neosynthesized DNA labeling, Fluorescence microscopy.

Haloferax volcanii is an archaea belonging to the phylum euryarchaeota and the class Halobacteriales. The mechanisms related to replication and repair in archaea are very similar to those found in eukaryotes, making *H. volcanii* a relevant model organisms for the study of replication and archaeal biology, especially since many genetic tools are available. Interestingly, all replication origins can be removed from the chromosome of *H. volcanii*, raising many questions about the mechanisms involved. Several hypotheses have been proposed on how this strain initiates its replication, either relying on recombination-dependent replication initiation or an origin-independent mechanism. In order to study these replication-related mechanisms, I have constructed a strain of *H. volcanii* able to incorporate thymidine analogues into DNA during its synthesis by deleting genes involved in the thymidine biosynthesis pathway. A short-time cultures of the strain in the presence of an analogue allows its incorporation in nascent DNA. By immunodetection of the analog coupled to fluorescence microscopy observation of whole cells, it is possible to investigate the localization of neosynthesized DNA, which

reflect the regions where replication is active. These analyses revealed mainly 2 to 3 active replication regions per cell, without any particular location. These regions had already been observed by studying the localization of a key replication protein (RPA2) fused to the fluorescent green protein GFP, confirming its location in active replication areas. A surprising variability in the number of replication foci from one cell to another was observed, suggesting a probabilistic initiation of replication. It is also surprising to observe so few active replication areas compared to the high polyploidy of this strain. This raises the question of what these replication areas correspond to. For further understanding, I developed for *H. volcanii* molecular combing, to isolate individual DNA molecules and specifically reveal incorporated analogues to determine the number of copies of the chromosome that are being replicated, as well as the number of active origins on each of the copies. I have also developed time-lapse approach to track these regions over time by monitoring cell proliferation directly under the microscope.

