



HAL
open science

Étude épistatique de RecN, et des liens entre la cohésion des chromatides sœurs et de la réparation de l'ADN chez *Escherichia coli*

Adrien Camus

► **To cite this version:**

Adrien Camus. Étude épistatique de RecN, et des liens entre la cohésion des chromatides sœurs et de la réparation de l'ADN chez *Escherichia coli*. Maladies infectieuses. Université Paris sciences et lettres, 2022. Français. NNT : 2022UPSLE029 . tel-04547409

HAL Id: tel-04547409

<https://theses.hal.science/tel-04547409v1>

Submitted on 15 Apr 2024

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.



THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à CIRB – Collège de France, Dynamique des Chromosomes

**Étude épistatique de RecN, et des liens entre la
cohésion des chromatides sœurs et de la réparation de
l'ADN chez *Escherichia coli*.**

Soutenue par

Adrien Camus

Le 24 juin 2022

École doctorale n° 562

Bio Sorbonne Paris Cité

Spécialité

Infectiologie, Microbiologie

Composition du jury :

Dr. Stéphanie Bury-Moné
Paris-Saclay

Présidente

Dr. Didier Flament
Centre de Bretagne Ifremer

Rapporteur

Dr. Vincent Pagès
Centre de Cancérologie de Marseille

Rapporteur

Dr. Angela Taddei
Institut Curie

Examinatrice

Dr. Olivier Espeli
Collège de France

Directeur de thèse



Titre : Étude épistatique de RecN, et des liens entre la cohésion des chromatides sœurs et la réparation de l'ADN chez *Escherichia coli*.

Mots clefs : *Escherichia coli*, RecN, Recombinaison homologue, cohésion des chromatides sœurs, Bléomycine, Mitomycine-C, Réparation par excision de nucléotides.

Résumé : Afin de préserver leur niche de vie, les bactéries produisent et sécrètent des antibiotiques avec des propriétés génotoxiques. Divers processus moléculaires maintiennent l'intégrité génomique de tous les organismes vivants. Ces événements sont primordiaux car la structure de l'ADN est endommagée en permanence par le métabolisme cellulaire (tel que le stress oxydatif ou lors de sa réplication), ou d'autres agents de l'environnement. Les antibiotiques sont utilisés pour des applications cliniques afin de traiter les infections ou le cancer.

Dans le travail ici présenté, nous analysons la réponse au stress génomique (GSR) induit par deux antibiotiques génotoxiques : la Bléomycine (BLM) et la Mitomycine-C (MMC). Ces deux antibiotiques altèrent l'ADN de différentes manières tout en conduisant à des cassures doubles brins (DSB). Les DSB sont suspectées d'être la cause principale de la mort cellulaire. Les DSB sont réparées par recombinaison homologue (HR). Des études récentes ont révélé que la HR est essentielle pour survivre aux lésions causées par la BLM et la MMC. Les premiers travaux sur le sujet, ainsi que les premiers modèles présentés dans les livres d'éducation, attribuent une voie de réparation particulière, selon le type de lésion à l'ADN.

La protéine RecN, induite par le régulon SOS, joue un rôle important dans la réparation de l'ADN et le traitement des lésions générées par ces deux antibiotiques. Cependant, la fonction de RecN dans ces deux processus n'est pas clairement comprise. RecN est une protéine qui joue un rôle dans la maintenance structurelle du chromosome (SMC). Elle se lie sur de l'ADN simple brin (ADNsb) (et qui peut attraper une seconde molécule d'ADN ?). *In vitro*, RecN stimule la ligation de molécules d'ADN. *In vivo*, RecN arrête la ségrégation des chromatides sœurs, et induit une compaction extrême du nucléoïde. La sur-expression de RecN est toxique pour les cellules et son niveau est régulé par l'enzyme ClpXP, faisant partie du protéasome. RecN interagit avec RecA, toutes deux sont requises pour survivre aux DSB induites par l'endonucléase I-SCE 1. Elles sont généralement associées dans le même groupe épistatique. Des résultats récents suggèrent que RecA et RecN pourraient également avoir des voies d'actions distinctes, toutes deux importantes pour la réparation de l'ADN. Dans l'étude que l'on présente, nous avons utilisé à notre avantage, son implication dans le processus de réparation de deux types de lésions, pour questionner l'implication de RecN dans la réponse génomique au stress (GSR).

Nous avons démontré que la dynamique des chromatides sœurs et que le changement de conformation du nucléoïde induit par RecN, est différent selon l'antibiotique utilisé. En présence de lésions induites par la MMC, RecN est requise en pré-traitement des lésions par « réparation par excision de nucléotide » (NER), et son activité sur les chromatides sœurs se manifeste tôt dans le processus de réparation. A l'inverse, en présence de lésions induites par la BLM, l'activité de RecN ne nécessite pas de traitement par le NER, et se manifeste plus tard, durant les phases de récupération. L'analyse par transposition insertion (TIS) a révélé que *recN* est un des rares gènes du SOS impliqué dans le GSR des deux antibiotiques. L'absence de RecN perturbe grandement le GSR, notamment par l'augmentation de la pression sur le système de réparation par excision de base (BER), tout en réduisant l'importance de la HR. L'analyse du TIS a également mis en évidence, l'implication extrême de multiples voies telles que : les pompes à efflux, la gestion du stress oxydatif, et le contrôle du cycle cellulaire, pour permettre une récupération de l'altération des dommages à l'ADN. L'activité de RecN est un point de bascule entre différentes solutions de réparation. Plus généralement, ce travail illustre que le GSR est un processus intégré que la cellule déploie pour générer les conditions de sa survie.

Remerciement

La thèse n'est pas juste un travail à abattre. C'est une quête qui structure un chemin de vie. Elle infuse une évolution forcée tant d'un point de vue scientifique, que personnel. Beaucoup de personnes ne se focalisent que sur l'ouvrage à accomplir en oubliant une partie de soi. Comme toute quête, elle est ponctuée de rencontres et de personnalités qui ont participé à sa réussite.

Ma quête a commencé bien avant ma thèse. La lutte contre la dyslexie a émergé au CE1. Un tournant a été réalisé lors de mon voyage de 2 ans en Australie. Au terme de ces deux années, j'ai récupéré la compétence de l'anglais, mais aussi un état d'esprit. Puis j'ai entrepris une reprise d'études après 5 ans d'interruption.

La somme des acteurs que je vais citer ont participé directement à ma réussite aussi bien d'un point de vue matériel, moral, environnement.

Je voulais aussi remercier toutes les personnes qui m'ont enrichi, soutenu et contribué à ma réussite.

- **Maryse Aïn** qui était la Directrice du Service de Formation Continue à la Faculté des Sciences d'Orsay de 2007 à 2011.
- **Elsa Petit** du Pole Ecology et Evolution à Paris-Sud que j'avais sollicité pour me présenter sa recherche, et qui m'avait permis de rencontrer différentes chercheuses et chercheurs pour discuter de leur travail de recherche.
- **Line Duportets** qui a été à l'écoute des élèves et a toujours tenu un discours constructif.
- **Solange Bertrand** qui a repris le DAEU-B après le départ de Maryse Aïn.
- **Martine Thomas** qui a apporté dès la L1 une vraie incarnation de ce que pouvait être la recherche, avec son cours très complet "initiation à la recherche". Ce type de formation, arrivant très tôt dans l'enseignement, est ce qu'on attend quand on arrive à l'université et motive.
- Les personnes de l'université Paris-Sud (Paris Saclay) qui globalement poussent les élèves à s'impliquer et sont bienveillant.
- **Hélène Timpano** qui a bien voulu m'accueillir en L1 pour mon premier stage chez Philippe Silar. Ces moments qui motivent.
- **M Ivo Gomperts Boneca** qui avait salué ma démarche proactive à ce moment-là et à son tour m'a accueilli en stage de L2.
- **Mme Ninke** qui travaillait avec Ivo Gomperts Boneca, et qui, par la suite, m'a apporté ses conseils et a suivi ma progression.
- **Elise Gasiorowski** pour ses conseils, le temps qu'elle m'a consacré pour la relecture de mon mémoire de stage de L3 et sa sincère bienveillance.
- **Tarek Msadek** qui m'a « challengé » toujours avec beaucoup d'humour.
- **Olivier Poupel** qui m'a guidé et a partagé ses connaissances et astuces.
- **Sarah Dubrak** pour sa patience et sa rigueur. Son aide dans ma recherche de thèse.

- **Carmen Buchrieser** avec qui on a partagé les verres du vendredi soir et qui a pris le temps de me recevoir et de me guider.
- **Stéphanie Bury-Moné** pour la philosophie et richesse de leurs masters ainsi que sa bienveillance et le soutien qu'elle apporte à ses élèves.
- **Frédéric Boccard et son équipe** qui m'ont accueilli pendant le master 2 en particulier **Virginia Lioy** et **Stephan Duigou**.
- **Virginia Lioy, Solange Miele, Elena Espinosa, Yoshi Yamaichi** avec qui des liens d'amitié se sont tissés en plus de l'intérêt scientifique.
- **Olivier Espéli** qui, en plus d'être un grand chercheur, est un homme bon, disponible et qui veille, dans la mesure du possible, à l'épanouissement de chacun, et qui a une dévotion sans faille pour son équipe.
- **L'équipe du laboratoire.** Remerciement à toute l'équipe de m'avoir accueilli et aiguillée. A **Élise** qui m'a transmis son savoir, avec qui j'aurais aimé partager davantage. **Brenna** qui est une super coach. Ainsi qu'à **Emma, Nicole, Céline** et aux stagiaires successifs qui rendais le quotidien léger et stimulant.
- **Arnaud Gutierrez, Pascal Servant** qui à plusieurs reprises durant mon parcours de formation m'ont porté de l'intérêt et des critiques constructives. Nos échanges m'ont fait grandir.
- **L'équipe de gestion du Collège de France** toujours présente, en particulier **Sandrine** qui nous éduquait avec sympathie aux rouages administratifs.
- **Les ressources Humaines du Collège de France, Françoise Crepin, L'assistante sociale** qui ont contribué à ma réussite.
- **Ma coach personnelle, Mme Carol Valet**, qui a permis la gestation de la thèse en me permettant de dompter et d'aller outre la dyslexie. Qui m'a auréolé d'un positivisme, et a participé à traiter l'aspect orthographique du mémoire.

Mes amis, et ma famille qui connaissent leurs importances.

Ma mère **Jocelyne Camus**, et à mon père décédé.

Il y a eu **Ludwig** qui m'a apporté son soutien et sa vision. Il a également permis de maintenir les conditions pour mes 6 ans de reprises d'étude.

Alison qui m'a redonné du courage, qui était dans une démarche de reconversion, et nous avons partagé les mêmes types de difficultés.

Table des matières

I.	TABLE DES FIGURES	11
II.	TABLE DES TABLEAUX	13
III.	TABLE DES ANNEXES.....	13
IV.	TABLE DES ABREVIATIONS.....	0
V.	INTRODUCTION	1
0	Préambule.....	2
1	<i>Escherichia coli</i> : quelques spécificités	3
1.1	Une bactérie qui vit en nous.....	4
1.2	<i>E. coli</i> a un fort pouvoir d'adaptation	6
1.3	<i>E. coli</i> pathogène, le second visage.....	8
1.4	La diversité d' <i>E. coli</i>	11
1.5	La plasticité du génome d' <i>E. coli</i>	12
2	Le cycle cellulaire.....	13
2.1	Structure de l'ADN.....	14
2.2	La réplication du chromosome d' <i>E. coli</i>	15
2.2.1	Le réplisome	17
2.2.2	La ségrégation du chromosome	19
2.2.3	L'Élimination des liens topologiques est nécessaire à la ségrégation des chromatides sœurs.....	23
2.3	La division cellulaire d' <i>E. coli</i>	26
2.3.1	L'ancrage du Ter.....	27
2.3.2	Le système d'occlusion du nucléoïde	28
2.3.3	Le système Min.....	29
2.3.4	La cytotinèse	30
3	Les antibiotiques affectant l'intégrité de l'ADN.....	32
3.1	Les quinolones et les coumarines	33
3.2	Les antibiotiques et agents anti cancéreux	35
3.3	La bléomycine : découverte et intérêts thérapeutiques	36
3.3.1	Bléomycine : propriétés moléculaires.....	37

3.3.2	Résistance endogène à la bléomycine chez <i>Streptomyces</i>	40
3.4	La Mitomycine-C découverte et intérêts thérapeutiques	41
3.4.1	Mitomycine-C : propriétés moléculaires	41
3.4.2	Résistance endogène aux mitomycines chez <i>Streptomyces</i>	47
3.5	Conclusion agents génotoxiques.	48
3.6	Les sources de cassures doubles brins (CDB).....	50
4	Les systèmes de réparation de l'ADN.....	51
4.1	La photoréactivation	51
4.2	La réparation des mésappariements (MMR).....	54
4.3	Induction des systèmes de réparation des alkylation de l'ADN	55
4.4	Induction par les stress oxydatifs chez <i>E. coli</i>.....	58
4.5	La réponse SOS.....	62
4.5.1	RecA : inducteur de la réponse SOS et élément central de la recombinaison homologue.	67
4.5.2	LexA : le verrou de l'induction.....	67
4.5.3	DnaA, un inducteur secondaire de certains gènes de la réponse SOS	69
4.5.4	SulA : point de contrôle de la reprise du cycle cellulaire.....	70
4.6	Réparation par excision de base « Base Excision Repair » (BER).....	71
4.7	La réparation par excision de nucléotides NER.	74
4.7.1	Organisation du complexe UvrABCD	75
4.7.2	Fonctionnement du NER	75
4.7.3	Le NER permet de ré-amorcer la transcription	78
4.8	La recombinaison homologue.....	79
4.8.1	RecBCD une des voies majeures permettant d'initier la RH.....	80
4.8.2	RecFOR la seconde voie permettant la RH.....	83
4.8.3	Le processus de recombinaison.....	85
4.9	La réparation non homologue par jonction des brins (NHEJ).....	88
4.10	Les ADN polymérase translésionnelles (TLS).....	89
5	RecN est un acteur essentiel et pourtant encore mal connu des réponses aux stress génotoxiques	90
5.1	La structure de RecN	90
5.2	RecN est de type SMC like	92
5.3	Les fonctions de RecN.....	96
5.3.1	Réparation des cassures doubles brins	96
5.3.2	Maintien des extrémités d'ADN fragmentées.....	98
5.3.3	Stabilisation des D-loop.....	99
6	RecN est dégradé par le protéasome ClpXP	100
6.1	La protéase ClpXP régule la quantité de RecN ainsi que d'autres protéines du SOS.....	100
6.1.1	La fonction de ClpXP	101
6.1.2	ClpXP cible RecN et d'autres protéines de la réponses SOS.....	102
VI.	OBJECTIFS DE LA THESE	106
VII.	ARTICLE	110
1	Article	111

1.1	Abstract :	111
1.2	Introduction	112
1.3	Results	113
1.4	Discussion	121
1.5	Material and Methods.....	124
1.6	References	126
1.7	Figures	129
2	Legends of the supplementary figures	145
3	Supplementary methods	154
VIII.	DISCUSSION	160
1	Une multitude de voies de réparation impliquées dans la prise en charge les lésions à la MMC et la BLM	161
1.1	Les voies de réparation en MMC	162
1.2	Les voies de réparation en BLM.....	164
1.3	Chez les mutants NER, la survie à la toxicité de la MMC dépend de réponse alternative au stress génomique	165
1.4	L'implication du NER différencie la réparation des lésions induites par la MMC et la BLM	167
1.5	Conclusion TIS	169
2	L'ADNsb comme substrat à la stabilisation de RecN ?	170
3	RecN module-t-il l'expression de certains gènes ?.....	171
4	Condensation du nucléoïde et cohésion des chromatides sœurs.....	172
4.1	L'action de RecN est dépendante du type de lésion.....	172
4.2	Utilisation et limitation de la méthode Hi-SC2 pour étudier les interactions entre chromatides sœurs ..	174
4.3	Modèle sur le fonctionnement de RecN pour la cohésion des chromatides sœurs	175
4.4	Élimination de RecN et reprise du cycle cellulaire normal.....	178
5	Ndd un antagoniste à l'action de RecN	178
6	Remarques finales	180
IX.	MATERIELS ET METHODES	182
1	Matériels et méthodes	183
1.1	Milieux de cultures.....	183

1.2	Tableau des solutions.....	183
1.3	Souches.....	184
1.4	Préparation d'un lysat liquide de phage P1 :.....	184
1.5	Transduction à partir d'un lysat liquide de phage P1 vir.....	184
1.6	Construction de RecN-3XF.....	185
1.7	Test de viabilité.....	185
1.8	Western-Blot.....	185
1.9	Test de dégradation de RecN.....	187
1.10	Test d'expression de la réponse SOS.....	189
1.11	Chip-Seq.....	190
1.12	Tn-Seq.....	190
1.13	Hi-SC2: Création de la banque de transposition.....	195
1.14	Microscopie.....	199

X. BIBLIOGRAPHIE 200

XI. ANNEXES 224

I. Table des figures

Figure 1 Représentation schématique de la diversité de modes de vie d' <i>E. coli</i>	7
Figure 2 Les six catégories reconnues d' <i>E. coli</i> IPEC	10
Figure 3 Schéma simplifié du cycle de division d' <i>E. coli</i>	14
Figure 4 Présentation de la structure moléculaire l'ADN et ses bases associées	15
Figure 5 Cycles de réplication du chromosome d' <i>E. coli</i> selon la vitesse de croissance....	16
Figure 6 Représentation schématique du réplisome d' <i>E. coli</i>	18
Figure 7 Modèles actualisés de la ségrégation du chromosome bactérien.....	22
Figure 8 Représentation de l'intervention des topoisomérases.....	23
Figure 9 Formations topologiques et leurs conséquences possibles	24
Figure 10 Structuration du chromosome en MD et organisation de l'ancrage du Ter.....	28
Figure 11 Le système MinCD et l'occlusion du nucléoïde	30
Figure 12 Étapes de la formation de l'anneau Z	31
Figure 13 Structure de la métallo-bléomycine et ses domaines d'organisation.	37
Figure 14 Formation de la forme « activée » de la bléomycine et ses conséquences.	38
Figure 15 Structure chimique des mitomycines	42
Figure 16 Type d'adduits pouvant être produits	43
Figure 17 Les différentes étapes menant à l'activation de la MMC <i>in vivo</i>	44
Figure 18 Structure d'un complexe mitomycine C-ADN monoalkylé.....	45
Figure 19 Variétés des voies de réparation prenant en charge diverses lésions.....	49
Figure 20 Lésion à l'ADN produit par les UV.....	53
Figure 21 Réparation de mésappariement	54
Figure 22 La réponse Ada aux agents alkylants.....	57
Figure 23 Prise en charge des O-alkylation et N-alkylation et leurs conséquences.	58
Figure 24 Modèle du mécanisme de régulation du métabolisme par OxyR.....	61
Figure 25 Modèle d'activation de la réponse SOS d' <i>E. coli</i>	69
Figure 26 Implication de la réponse SOS sur la division cellulaire	71
Figure 27 Représentation schématique de la voie de réparation du BER	73
Figure 28 Représentation schématique de la voie du NER	77
Figure 29 Réparation dépendant de RecBCD.....	81
Figure 30 Processus de résection de RecBCD	82
Figure 31 Étapes de la Recombinaison Homologue	87
Figure 32 Modèle de RecN_D.....	91
Figure 33 Architecture des complexes SMC	93

Table des figures

Figure 34 Modèle de capture de l'ADN par des SMC.	95
Figure 35 Modèle préliminaire de la prise en charge des CDB par RecN_D	99
Figure 36 Modèle en cartoon de ClpXP et les motifs peptidiques reconnues	102
Figure 37 Phénotype de la division défectueuse chez les mutants $\Delta clpP$	104
Figure 38 Modèle des relations entre RecN, ClpXP et la reprise du cycle cellulaire	105
Figure 39 Représentation des résultats du TIS en MMC	163
Figure 40 Représentation des résultats du TIS en BLM	164
Figure 41 Voies de support à la réparation de l'ADN	166
Figure 42 Voie de réparation chez <i>E. coli</i> impliquant le NER à la suite d'une ILC	167
Figure 43 Schéma récapitulatif des différents systèmes interconnectés servant la survie en BLM et MMC	169
Figure 44 Étapes de cohésions / condensations à la suite de lésions en MMC	176
Figure 45 Étapes de cohésions / condensation à la suite de lésions en BLM	176
Figure 46 Modèle représentant un mode d'inhibition possible de RecN par Ndd	179

II. Table des tableaux

Tableau 1 Gènes de la réponse contre les agents alkylants.....	56
Tableau 2 Opéron régulé par OxyR chez <i>E. coli</i>	59
Tableau 3 Gènes induits lors de la réponse SOS.....	63
Tableau 4 Glycosylases chez <i>E. coli</i>	72
Tableau 5 Concentrations des solutions stocks.....	183
Tableau 6 Buffer de test de dégradation de RecN.....	188
Tableau 7 Des amorces du du TnSeq	194

III. Table des annexes

Annexe 1 Tableau des souches	225
Annexe 2 Tableau des plasmides	229
Annexe 3 Tableau des amorces	230
Annexe 4 Analyse de la synchronisation en cytométrie en flux après 20 min de MMC .	237
Annexe 5 Analyse de la synchronisation en cytométrie de flux après 10 min de MMC .	238
Annexe 6 Enrichissement des fractions immuno précipitées Chip-Seq de RecN-3XF	239
Annexe 7 Test de dégradation de RecN <i>in vitro</i>	239
Annexe 8 Scripts Hi-SC2 : conversion des données brutes de séquencages.....	240
Annexe 9 Scripts Hi-SC2 : comptage du nombre de sites <i>loxP</i> total et recombinés.....	243
Annexe 10 Scripts Hi-SC2 : création des graphiques.	245
Annexe 11 Poster congrès.....	257
Annexe 12 Poster de vulgarisation scientifique pour la fête de la science	258

IV. Table des abréviations

A

acides ribonucléiques · ARN

B

Beta subtilis · *B. subtilis*
bléomycine · BLM

C

Caulobacter crescentus · *C. crescentus*
centre de réparation · CR

E

E. coli extra-intestinal pathogénique · ExPEC
E. coli intestinal pathogénique · IPEC
Element d'ouverture de l'ADN · DUE
Escherichia coli · *E. coli*
espèces azotées réactives · RNS
espèces réactives de l'oxygène · ROS

F

flavine adénine dinucléotide · FAD

I

Inter strand Cross Link · ICL

J

jonctions d'Holliday · HJ

L

lactopéroxydase · LP

Linking number · LK

M

macrodomaine · MD
méga paires de bases · Mpb
mitomycine-C · MMC
myéloperoxydase · MP

O

origine de réplication · oriC

P

protéines de structure et maintenance du chromosome · SMC

R

recombinaison homologue · RH
réparation couplée à la transcription · TCR
réparation par excision de nucléotides · NER
Réponse au Stress Génotoxique · GSR

S

Single Strand Binding · SSB
site apurinique/aprimidinique · AP
SMC de *Bacillus subtilis* · BsSMC
Streptomyces lavendulae · *S. lavendulae*
syndromes hémolytique et urémique · SHU

W

Western-Blot · WB

V. Introduction

0 Préambule

Les molécules d'ADN présentes dans les organismes vivants sont fréquemment endommagées par des évènements physiques, des agents chimiques ou biomoléculaires. Pour survivre à ces lésions, les cellules disposent d'un arsenal de systèmes de réparation. Les procédés de réparation de l'ADN diffèrent selon le type de lésions.

Mes recherches se sont axées sur les processus de réparation des cassures doubles brins de l'ADN et plus particulièrement ceux impliquant la protéine RecN.

L'objectif de mon travail de doctorat est de comprendre le fonctionnement de la protéine RecN dans le processus de réparation et de reconfiguration de l'architecture du chromosome. Je me suis principalement intéressé à caractériser les voies de réparation de l'ADN dans lesquelles RecN intervient, à comprendre le rôle de certains de ses partenaires et les conséquences de son absence sur le choix du chemin de réparation.

J'ai réalisé ce travail au Centre de Recherche Interdisciplinaire en Biologie du Collège de France au sein de l'équipe « Dynamique du chromosome » sous la supervision du Docteur Olivier Espeli.

Le premier chapitre de cette introduction (***Escherichia coli* : quelques spécificités**) va me permettre de présenter mon modèle d'étude, la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) : Un des plus anciens et plus important modèle pour l'étude de la réparation de l'ADN. Cela me permettra d'introduire des concepts de plasticité génétique et de les placer dans le contexte du cycle de vie d'*E. coli*. Cette partie inclut également une présentation des modes de vie adoptés par cette bactérie et de l'importance de son adaptabilité pour survivre à divers environnements.

Le second chapitre (**Le cycle cellulaire**) traite du cycle cellulaire d'*E. coli*. RecN et la réponse SOS¹ perturbant ce cycle cellulaire, j'ai jugé important de le décrire en détail.

¹ La réponse SOS appartient aux systèmes de réparation de l'ADN, c'est un système induit lors de présence de certaines lésions à l'ADN.

Le troisième chapitre (**Les antibiotiques affectant l'intégrité de l'ADN**) décrit certains agents génotoxiques et leurs modes d'actions, qui sont importants pour appréhender les voies de réparation de l'ADN, et par conséquent le rôle de RecN.

Le quatrième chapitre (**Les systèmes de réparation de l'ADN**), reprend l'ensemble des voies de réparation de l'ADN connues.

Le cinquième chapitre (**RecN est un acteur essentiel et pourtant encore mal connu des réponses aux stress génotoxiques**), présente de manière exhaustive la littérature parue au sujet de RecN depuis sa découverte dans les années 80. Il exposera également la famille de protéines « maintenance du chromosome », celle-ci intervenant sur l'architecture du chromosome.

Le sixième chapitre et dernier chapitre (**RecN est dégradé par le protéasome ClpXP**) décrira le système ClpXP, qui intervient dans la dégradation de RecN et qui participe à la reprise du cycle cellulaire.

Les résultats expérimentaux obtenus durant mon doctorat sont décrits sous la forme d'un article. Les conclusions et perspectives de ce travail sont abordées dans le dernier chapitre.

1 *Escherichia coli* : quelques spécificités

En 1884, Theodor Escherich commença à étudier les microbes de l'intestin d'enfants, ainsi que leurs rôles dans la digestion et les maladies. Il découvrit une bactérie avec la capacité remarquable de pousser rapidement. Il la nomma *Bacterium coli commune*, qu'on nomme désormais *Escherichia coli* (Escherich 1988). Cette bactérie fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*, située dans la subdivision gamma du phyla *Proteobacteria*. C'est une bactérie Gram-Negative, anaérobie facultative. Elle est connue pour faire partie de la flore intestinale des mammifères (Kaper, Nataro, and Mobley 2004).

E. coli s'est imposée comme organisme modèle grâce à plusieurs atouts : elle se multiplie rapidement dans différents milieux, elle peut se multiplier à des températures comprises entre 7°C et 50°C, avec pour température optimale 37°C. On peut également l'isoler de n'importe quel humain. Son étude a un intérêt médical car elle est responsable de diverses maladies. Une grande multiplicité des souches pathogènes a été décrite. Au 20ème siècle, les

études menées sur cette bactérie ont permis la mise en évidence de la réplication de l'ADN, de la transcription des ARN messagers, du transfert d'information génétique par conjugaison, des bactériophages, des enzymes de restrictions (Crick et al. 1961; Nirenberg et al. 1965). Sa facilité d'utilisation l'a conduite à être l'une des bactéries les plus utilisées en recherche académique et commerciale. Ceci a ensuite permis de faire émerger la biologie synthétique, servant à la production pharmaceutique, et l'industrie des biotechnologies ; contribuant ainsi à hauteur de 500 milliards de dollars de l'économie globale en 2011 (Bruschi et al. 2011).

1.1 Une bactérie qui vit en nous

E. coli fait partie du microbiote intestinal des mammifères, oiseaux, reptiles et poissons. Le microbiote est la somme de tous les micro-organismes (c'est-à-dire les bactéries, les archées, les eucaryotes et les virus) qui résident dans un hôte, ou sur une partie spécifique. On la retrouve également dans l'environnement : la terre, l'eau, les plantes, et dans la nourriture (Leimbach, Hacker, and Dobrindt 2013).

Chez les mammifères, les *E. coli* persistent dans les couches du mucus du cæcum et du colon. Elles y forment des communautés avec d'autres organismes de la flore intestinale. La population du microbiote est extrêmement importante en quantité et en diversité, ce qui représente la somme de 10^{12-14} microorganismes, l'équivalent de la masse d'un organe de plusieurs kg ([source INSERM](#)). Le microbiote est constitué de plus de cinq-cents groupes taxonomiques (Sommer and Backhed 2013). La communauté microbienne intestinale est dominée par des anaérobies obligatoires, tels que les membres des *Bacteroides* et des *Firmicutes*, qui représentent à eux seuls ~90 % de la population microbienne intestinale totale (Claesson et al. 2012), alors que la population d'*E. coli* ne constitue que 0.1 à 5%.

Sa niche est située entre différentes couches de mucus produites par l'intestin. Ces couches ont différentes textures (plus ou moins visqueuses), les *E. coli* y prospèrent en communautés sous forme de biofilms multi-espèces. Un biofilm est caractérisé par une matrice extracellulaire composée de polysaccharides, de protéines et d'ADN. Dans le biofilm, *E. coli* est en compétition pour récupérer des nutriments (Chang et al. 2004; Beloin, Roux, and Ghigo 2008). Mais l'environnement riche en nutriments lui permet de maintenir sa population entre 10^6 cellules par gramme de matière fécale, indépendamment de son élimination régulière (Savageau 1983; Chang et al. 2004). *E. coli* est aussi affectée par les virus présents

dans l'intestin de l'hôte, contre lesquels elle se défend avec des enzymes de restriction, qui sont de nos jours des outils essentiels en biologie moléculaire (Kasarjian, Iida, and Ryu 2003).

L'organisme hôte régule soigneusement son microbiote. Par exemple, la formation de biofilm d'*E. coli* est favorisée par la sécrétion d'anticorps (immunoglobulines A) au travers des parois de l'intestin, et excrétée dans le mucus (Bollinger et al. 2003), repoussant ainsi les bactéries hors de la surface de la paroi intestinale.

E. coli a longtemps été considéré comme un commensal de l'être humain. On parle de commensal quand un organisme loge une bactérie sans réelle utilité pour l'hôte, sans être pour autant délétère, sa présence est donc neutre. Désormais, il est de plus en plus admis que la relation hôte-*E. coli* est en réalité mutualiste, donc bénéfique aux deux êtres. En effet, les *E. coli* produisent de la vitamine K et de la vitamine B12, qui sont toutes deux nécessaires aux hôtes mammifères (Lawrence and Roth 1996), quand l'hôte apporte en retour des nutriments et un environnement stable.

E. coli a aussi une autre utilité : elle maintient un environnement favorable aux anaérobies en consommant l'oxygène qui pénètre dans l'intestin. Le dioxygène est en effet un poison mortel pour les anaérobies obligatoires. Plus important encore, *E. coli* participe à l'exclusion de pathogènes par compétition de surface (Chang et al. 2004).

La colonisation de l'hôte commence à la naissance. L'enfant va récupérer la flore selon son passage, (par voie vaginale ou par la peau à la suite d'une césarienne). Par la suite, la diversité viendra également par le sein de la mère si l'allaitement est naturel. Du fait de l'environnement hautement oxydatif dans l'intestin du nouveau-né, la première colonisation se fait par des anaérobies facultatifs tel que les *Proteobacteria*. Elles permettent d'ajuster les conditions environnementales pour diminuer le taux d'oxygène, ce qui permet une colonisation successive par d'autres genres : les *Bacteroides* et des membres du phyla *Actinobacteria* et *Firmicutes*. Le microbiote se stabilise en composition et en diversité avant l'âge de 4 ans (Sommer and Backhed 2013).

Durant le processus de gestation, *E. coli* devient de plus en plus abondant dans le microbiote de la mère, augmentant la dose d'inoculation lors de la naissance (Koren et al. 2012). Les souches colonisatrices ont certaines capacités : des systèmes de sécrétion et des excroissances fibreuses, les pili, qui leur permettent de se fixer à l'épithélium intestinal

(Feeney, Cooke, and Shinebaum 1980; de Muinck et al. 2013). Puis c'est par strates successives que d'autres bactéries vont pouvoir s'implanter au fur et à mesure. En retour de cette colonisation, la structure et le fonctionnement de l'épithélium se modifient. Ce dialogue entre la bactérie et son hôte va permettre la mise en place de l'immunité, et participer à la tolérance immunologique (Tomas et al. 2015).

1.2 *E. coli* a un fort pouvoir d'adaptation

E. coli est capable de survivre dans l'environnement à l'extérieur de l'hôte avant de pouvoir réintégrer un nouvel hôte. L'environnement extérieur est inconstant, les paramètres physico-chimiques tels que la température, l'oxygène, l'humidité, le pH, et les autres communautés bactériennes, fluctuent considérablement (Savageau 1983; van Elsas et al. 2011). Sa capacité d'adaptation, à l'échelle de la population, est permise par la grande flexibilité de son métabolisme, et de sa plasticité génomique.

E. coli peut s'établir de façon pérenne dans les sols, l'eau, et avec les communautés vivant au niveau des racines des plantes. Elle peut vivre sous la forme planctonique ou en communauté sous forme de biofilm. Il a également été observé des groupes d'*E. coli* sur des surfaces faibles en humidité qui se rassemblent et effectuent des mouvements coordonnés (comme un ban de poisson) : une forme de comportement « social » également observé chez d'autres bactéries (Harshey 2003). Sur la **Figure 1** sont représentés différents modes de vie d'*E. coli*.

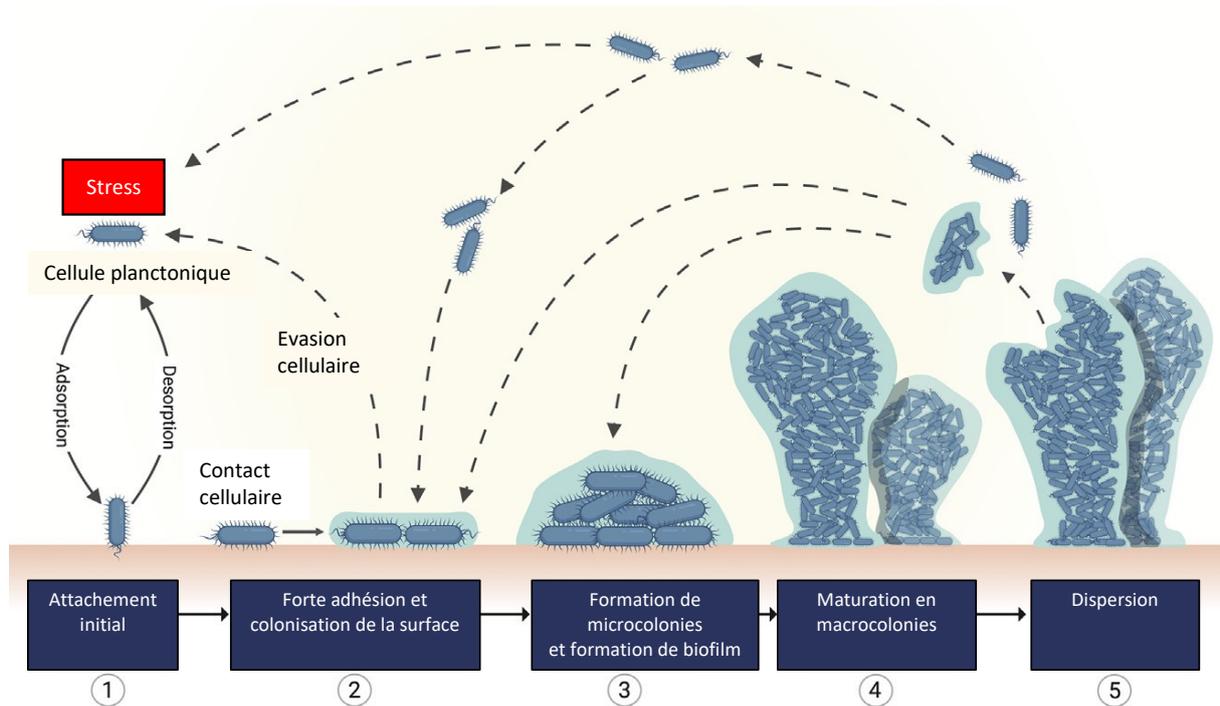


Figure 1 Représentation schématique de la diversité de modes de vie d'*E. coli*

Représentation schématique de la formation d'un biofilm d'une seule espèce bactérienne sur une surface solide. Ce schéma décrit les cinq principales étapes de la formation et de la propagation des biofilms. 1 l'attachement initial de la bactérie en formation planctonique sur une surface solide. 2 une fois sur un support, elle s'y fixe pour se diviser et former une colonie. 3 Après la formation d'une microcolonie 4 maturation de la colonie en macrocolonie. 5 dispersions par détachement du biofilm. Figure empruntée à (Guzman-Soto et al. 2021).

D'ailleurs, des unités de recherches ont identifié des lignées divergentes qui semblent s'être adaptées en premier lieu à une vie en dehors d'un hôte. Ce sont les résultats d'études d'analyses génomiques et phylogénétiques de souches d'*E. coli* (Walk et al. 2009).

Une des stratégies de survie bactérienne, c'est l'émergence de « persisters ». Non spécifique à *E. coli*, un persister est défini comme une bactérie qui est tolérante aux antibiotiques, sans développer de résistances génétiques. Cette capacité viendrait de leur faible inactivité métabolique, qui pourrait s'apparenter à une forme d'hibernation ou de stase transitoire. Par conséquent, les antibiotiques qui ont une action sur le métabolisme, sont inopérants. Les persisters pourront éventuellement sortir de leurs stases quand l'environnement le permettra, ou alors, à terme, elles finiront par mourir. Ce mode de survie semble se mettre en place de façon stochastique, sur un infime pourcentage d'une population bactérienne (Lewis 2010; Balaban et al. 2004). Cette capacité joue certainement un rôle dans

la survie des bactéries dans un environnement fluctuant fortement, aussi bien en extérieur que lors de la pathogénicité.

Malgré tout, des facteurs peuvent favoriser la représentativité de telles populations, certaines voies semblent importantes pour initier cet état, comme la voie de la réponse SOS (Lewis 2010). Les persisters sont un défi pour traiter totalement certaines maladies sans risque de rechute.

1.3 *E. coli* pathogène, le second visage

E. coli peut être pathogène et la cause de diarrhées, de péritonites, de colites, ainsi que d'autres maladies. La mortalité infantile et les infections des voies urinaires liées à cette bactérie coûtent la vie à plus de deux millions d'humains chaque année (Russo 2003). Certaines souches peuvent également favoriser l'apparition de cancers par la production d'inflammations chroniques (Arthur et al. 2012). C'est d'ailleurs ce que l'on observe également avec les gastrites chroniques induites par *Helicobacter pylori* (Khatoun, Rai, and Prasad 2016).

Les souches pathogènes d'*E. coli* sont divisées en deux grands groupes selon le site de l'infection : *E. coli* intestinal pathogénique (IPEC) et *E. coli* extra-intestinal pathogénique (ExPEC). Chaque groupe est subdivisé en sous-catégories : les pathotypes. Ils sont définis comme un ensemble de souches d'une même espèce, avec certaines caractéristiques pathogéniques. La classification de pathotypes est basée sur la description médicale de la maladie, des facteurs de virulence et de la lignée phylogénétique.

Les ExPEC (extra-intestinaux) sont pour la plupart des habitants asymptomatiques du tractus intestinal qui provoquent des maladies extra-intestinales après avoir migré vers d'autres parties du corps, comme les voies urinaires ou la circulation sanguine (Poirel et al. 2018).

Les IPEC sont responsables de troubles plus ou moins sévères, qui vont de la diarrhée légère, à la colite sévère pouvant mener à la mort. Elles produisent certains facteurs de virulence classés en fonction de l'endroit et de la manière dont elles provoquent la maladie.

Ces souches comprennent entre autres les *E. coli* : entéro-agrégatifs (EAEC), entéro-hémorragiques (EHEC), entéro-invasive (EIEC) entéro-pathogénique (EPEC), entéro-toxigène (ETEC), uro-pathogènes (UPEC), adhérentes-diffusives (DAEC), adhérente-invasives (AIEC) (Kaper, Nataro, and Mobley 2004). La description de certains mécanismes intrinsèques à ce dernier pathotype est présentée **Figure 2**.

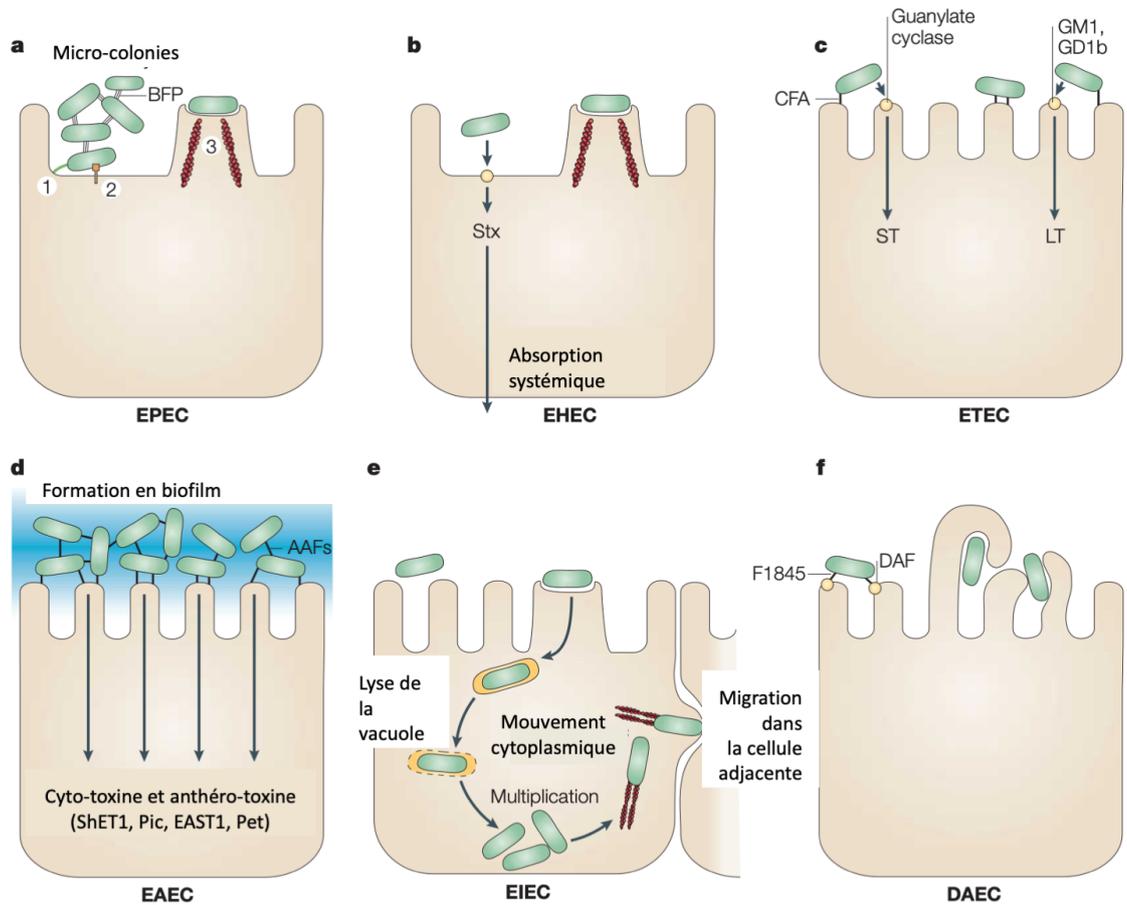


Figure 2 Les six catégories reconnues d'*E. coli* IPEC

Six catégories d'*E. coli* diarrhéiques. L'interaction de chaque catégorie avec une cellule cible est représentée ici de manière schématique. **a.** Les EPEC adhèrent aux entérocytes de l'intestin grêle, mais détruisent l'architecture des microvillosités, induisant des lésions dues à l'attachement et à la disparition des microvillosités. Les dérèglements du cytosquelette s'accompagnent d'une réaction inflammatoire et de diarrhée. Les étapes sont 1. Adhésion initiale, 2. translocation des protéines à l'aide d'un système de sécrétion de type III, 3. formation du piédestal. **b.** Les EHEC induisent également des lésions dues à l'attachement et à la disparition des microvillosités dans le côlon. La caractéristique distinctive des EHEC est l'élaboration de Shiga-toxine (Stx), dont l'absorption systémique entraîne des complications potentiellement mortelles. **c.** Les ETEC adhèrent aux entérocytes de l'intestin grêle et induisent des diarrhées aqueuses par la sécrétion d'entéro-toxines thermolabiles (LT) et/ou thermostables (ST). **d.** Les EAEC adhèrent aux épithéliums de l'intestin grêle et du gros intestin en un biofilm épais et sécrètent des entéro-toxines et des cytotoxines. **e.** Les EIEC envahissent la cellule épithéliale colique, lysent le phagosome et se déplacent dans la cellule en nucléant les microfilaments d'actine. La bactérie peut alors se déplacer latéralement dans l'épithélium de cellule à cellule ou sortir et rentrer dans la membrane plasmique baso-latérale. **f.** La DAEC induit un effet de transduction de signal caractéristique dans les entérocytes de l'intestin grêle qui se manifeste par la croissance de longues projections cellulaires en forme de doigts, qui s'enroulent autour de la bactérie. AAF : 'aggregative adherence fimbriae' ; BFP : bundle-forming pilus ; CFA : "colonization factor antigen" ; DAF : "decay-accelerating factor" ; EAST1 : "enteroaggregative *E. coli*" ST1 ; LT : "heat-labile enterotoxin" ; ShET1 : "Shigella enterotoxin 1" ; ST : "heat-stable enterotoxin". Figure empruntée à (Kaper, Nataro, and Mobley 2004).

Les différences de mode de vie font d'*E. coli* un bon spécimen d'étude pour les interactions entre hôtes / bactéries, et l'étude de la frontière ténue entre mutualisme, commensalisme et pathogénie.

Chez les pathogènes, un des exemples le plus connu d'*E. coli* entéro-hémorragique est la souche O157:H7. Cette souche produit la protéine shiga-like (Griffin and Tauxe 1991). Cette toxine se lie aux glycosphingolipides des membranes cellulaires et affaiblit les petits vaisseaux, tue les cellules intestinales, cause des diarrhées sanglantes, de sévères douleurs abdominales, ainsi que des syndromes hémolytiques et urémiques (SHU). Le traitement peut être difficile car l'utilisation d'antibiotiques est contre-productif et augmente le risque de SHU donc de mortalité. Par conséquent, le traitement se limite généralement à l'administration de liquide, à une alimentation adéquate, à des médicaments contre la douleur et la fièvre et à des transfusions sanguines si nécessaire (Smith et al. 2012).

1.4 La diversité d'*E. coli*

Les nombreuses souches pathogènes d'*E. coli* témoignent de la diversité de cette "espèce" microbienne, dont l'ampleur n'a été révélée que par l'avènement du séquençage du génome entier. Par exemple, les séquences génomiques ont permis de placer toutes les souches de *Shigella* au sein d'un clade plus large des *E. coli* (Pupo, Lan, and Reeves 2000). Le séquençage a permis de découvrir la remarquable plasticité et le dynamisme du génome d'*E. coli*, contribuant à sa diversité génétique et phénotypique. En 2002, Welch *et al.* ont établi que trois souches *E. coli*, K-12, O157:H7 et l'uro-pathogénique CFT073, ne partagent entre elles que 39,2% de leurs gènes (Welch et al. 2002). Le séquençage d'un plus grand nombre de souches a réduit ce génome-cœur à moins de 20 % sur plus de 16 000 gènes du pangénome d'*E. coli* (Kaas et al. 2012). Les gènes restants constituent la partie variable ou « flexible » du génome, une sorte de customisation de variations génétiques qui peut être acquise par transfert de gènes horizontaux (Leimbach, Hacker, and Dobrindt 2013).

Ces variations incluent des prophages, des transposons, et des gènes accessoires. Ces gènes codent des fonctions qui améliorent la « fitness » dans des niches spécifiques, améliorent l'adaptabilité métabolique, et ont des rôles sur la pathogénicité (Touchon et al.

2009). Cette capacité de mélanger et d'associer des éléments génétiques accessoires permet de supposer que de nouvelles souches d'*E. coli* avec de nouvelles combinaisons de gènes peuvent émerger rapidement.

La taille du génome d'*E. coli* peut varier grandement d'une souche à l'autre. Quand les souches les plus communes ont environ ~4,5 millions de paires de bases, et 4 000 gènes, les souches pathogènes peuvent avoir un génome de 5,9 millions de paires de bases et 5 500 gènes (de Muinck et al. 2013).

1.5 La plasticité du génome d'*E. coli*

Le séquençage intégral des génomes a permis de mieux comprendre la plasticité génomique des bactéries et plus particulièrement de la famille des *E. coli*. Le génome d'une espèce peut être classé en deux groupes :

D'une part, le génome « cœur » qui est défini comme l'ensemble des gènes qui sont présents dans toutes les souches d'une espèce bactérienne. Il comprend la plupart des gènes domestiques essentiels impliqués dans la réplication, la transcription et la traduction. Le génome "cœur" constitue les gènes essentiels d'une espèce bactérienne et définit les fonctions métaboliques de base.

D'autre part, le génome « flexible » comprend des gènes présents dans quelques souches ou uniques à certains isolats, appelés singletons. Ces gènes sont responsables de divers phénotypes et adaptations à des conditions environnementales spécifiques dans une population ou une espèce.

Les éléments mobiles, tels que les plasmides, les phages et les îlots génomiques, constituent le patrimoine génétique flexible, résumé sous le terme " mobilome " qui conduit à la plasticité génomique d'*E. coli*. Dans le contexte de la pathogénicité, l'ensemble des gènes « flexibles » codent pour la forme et les facteurs de virulence, qui vont permettre de coloniser l'hôte et de déclencher une maladie. La combinaison du génome « cœur » et du génome « flexible » constitue le pangénome, c'est-à-dire le répertoire génétique total d'une espèce.

Les facteurs de diversité génomique sont multiples : ils peuvent être dus à : l'accumulation de mutations ponctuelles, à la réduction de portions de génome par des événements de délétion et à l'incorporation de gènes par transfert horizontal. Le transfert

horizontal de gènes est l'intégration dans le chromosome d'ADN reçu ou capturé par la bactérie, par exemple par conjugaison. Un des moyens permettant d'incorporer ces fragments d'ADN est le phénomène de recombinaison homologue (Dobrindt et al. 2004). Chez *E. coli* la conjugaison nécessite le traitement par un complexe protéique : RecBCD responsable pour 99% des évènements de recombinaison par conjugaison dans les souches sauvages (Horii and Clark 1973). En outre, les gènes auxiliaires sont également transportés par de l'ADN « mobile » tel que les transposons (à l'exception du cas particulier des transposons conjugatifs, qui peuvent se transmettre eux-mêmes) (Dobrindt et al. 2004). La diversité qui en résulte peut ensuite se propager « verticalement » au sein d'une population par prolifération clonale. Le chromosome bactérien est hautement organisé, en relation avec les processus cellulaires tels que la réplication, la ségrégation et la transcription.

2 Le cycle cellulaire

Comme nous l'avons vu, *E. coli* est une bactérie qui doit pouvoir s'adapter aux multiples environnements auxquels elle est soumise. Son cycle cellulaire est variable et s'ajuste aux conditions rencontrées. Il dépend de la richesse en nutriments du milieu, de la température, des différents stress auxquels elle peut être soumise. Elle peut en effet se retrouver dans des milieux extérieurs (terre, rivière...) ou comme commensal ou pathogène au sein de notre intestin. De plus, elle a également la particularité de pouvoir vivre sous forme planctonique, ou à l'opposé, en communauté en formant des biofilms. Tous ces modes de vie influencent sa vitesse de croissance et son cycle cellulaire. Dans ce chapitre, je décrirai les principaux évènements du cycle cellulaire et j'insisterai sur certains dangers pour l'intégrité de l'ADN qui y sont associés et sur les moyens disponibles chez *E. coli* pour limiter leur impact.

Le cycle cellulaire correspond à une succession d'étapes (présenté **Figure 3**), pour finalement se diviser et aboutir à deux cellules filles identiques. Chaque étape est clé dans le maintien de l'intégrité cellulaire.

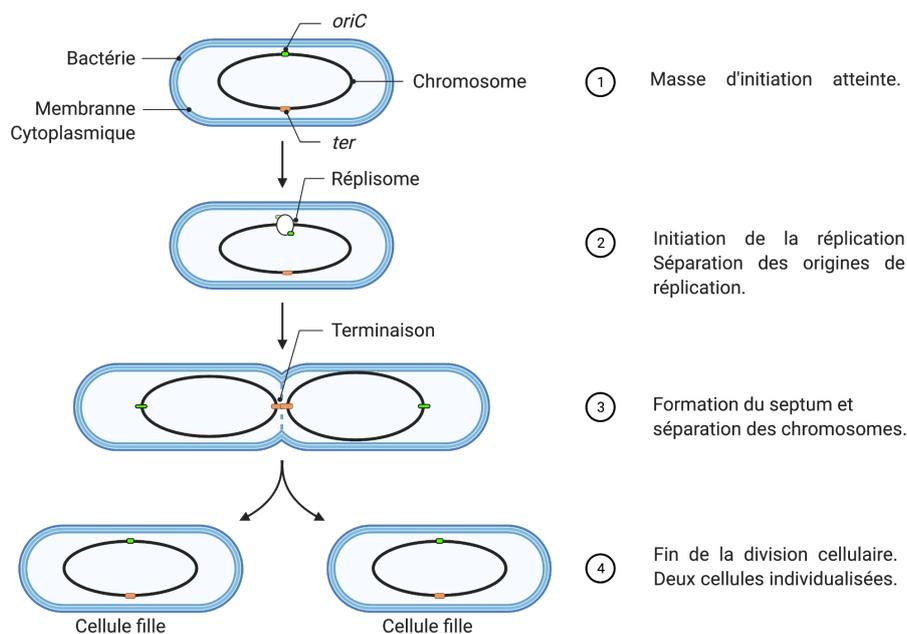


Figure 3 Schéma simplifié du cycle de division d'*E. coli*.

La réplication du chromosome s'initie à l'origine de réplication (*oriC*) pour se terminer au terminus (*ter*). **1.** L'origine de réplication migre au centre de la cellule avant d'initier un cycle. **2.** La réplication s'initie à l'origine de réplication : l'*ori*, est bidirectionnelle et se termine au *ter*. **3.** Le *ter* reste au centre de la cellule, alors que les origines dupliquées migrent aux pôles opposés de la cellule. Le septum se forme. **4.** Deux cellules filles normalement identiques.

2.1 Structure de L'ADN

La structure de l'ADN porte l'information génétique à partir des nucléotides qui la composent. Les nucléotides sont des molécules organiques composées d'une base azotée telle que « A,T,C,G » pour : Adénine, Thymine, Cytosine, Guanine. Les C et G sont des purines. A et T sont des pyrimidines. Il est essentiel pour la cellule que son ADN soit répliqué avec la plus grande fidélité afin de maintenir l'information génétique permettant son fonctionnement d'une génération à une autre.

La nature semi-conservative de la réplication de l'ADN a été prédite à partir de la structure de Watson & Crick (Watson and Crick 1953), puis démontrée expérimentalement pour l'ADN bactérien en 1958 (Meselson and Stahl 1958). En 1963, John Cairns définissait la première autoradiographie de la réplication avec de la thymidine marquée [³H]-thymidine, afin de comprendre son incorporation dans le chromosome circulaire d'*E. coli* (Cairns 1963). L'ADN forme une structure en double hélice antiparallèle tel que présenté **Figure 4**.

C'est grâce à cette structure unique que les processus de réplication et de réparation peuvent se faire : le brin opposé est utilisé comme matrice pour la synthèse du brin complémentaire.

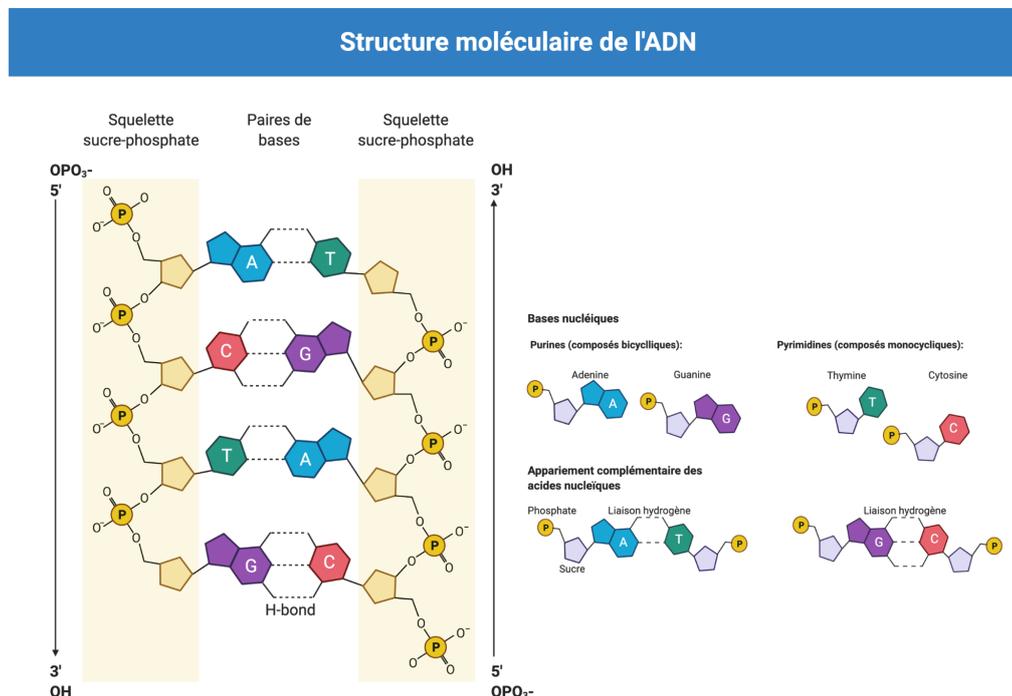


Figure 4 Présentation de la structure moléculaire l'ADN et ses bases associées

Appariement des bases dans l'ADN. Deux liaisons hydrogènes relient T à A ; trois liaisons hydrogènes relient G à C. Les squelettes sucre-phosphate (en clair) sont antiparallèles l'un à l'autre, de sorte que les extrémités 3' et 5' des deux brins sont alignées. Figure inspirée de Nature Éducation 2013.

2.2 La réplication du chromosome d'*E. coli*

La plupart des bactéries ne possèdent qu'un seul chromosome circulaire mais des bactéries avec plusieurs chromosomes ou des chromosomes linéaires ont été décrites. *E. coli* K12 MG1655, le modèle d'étude utilisé pour mon projet, est une bactérie disposant d'un unique chromosome circulaire d'environ 4,6 mégas paires de bases (Mpb). La réplication s'initie à partir d'un site unique baptisé : origine de réplication ou *oriC*. A l'inverse, les eucaryotes, et certaines archées tels que *Sulfolobus solfataricus* ou *Sulfolobus acidocaldarius* ont plusieurs origines de réplication fonctionnelles (Kelman and Kelman 2004).

Chez *E. coli*, la réplication est bidirectionnelle, et se termine au site opposé dans la région terminale : le « *terminus* ». Deux fourches de réplication se forment de part et d'autre d'*oriC*. Ce sont les sites actifs de la synthèse nucléique qui se déplacent le long du chromosome dans

des directions opposées. La réplication de son chromosome ne peut être plus rapide que 40 min, or, dans des conditions de culture optimale, *E. coli* se divise toutes les 20 min. Pour se diviser aussi rapidement, elle a développé au fil de l'évolution, la stratégie d'initier un nouvel événement de réplication avant même que le précédent ne soit achevé (Cooper and Helmstetter 1968). De ce fait, l'initiation de la réplication de la cellule fille peut avoir commencée dans la génération « mère » ou précédente (Wallden et al. 2016). L'illustration du cycle cellulaire comparé au cycle de réplication du chromosome est présentée **Figure 5**. Cette astuce lui permet d'avoir l'un des taux de division les plus rapides chez les bactéries (Gibson et al. 2018).

Ces cycles de réplication chevauchants génèrent un autre avantage pour la cellule : la présence en multicopie de la plupart du génome et donc une capacité supérieure de réparation d'une lésion ADN par recombinaison homologue, voie de réparation qui nécessite une copie non endommagée.

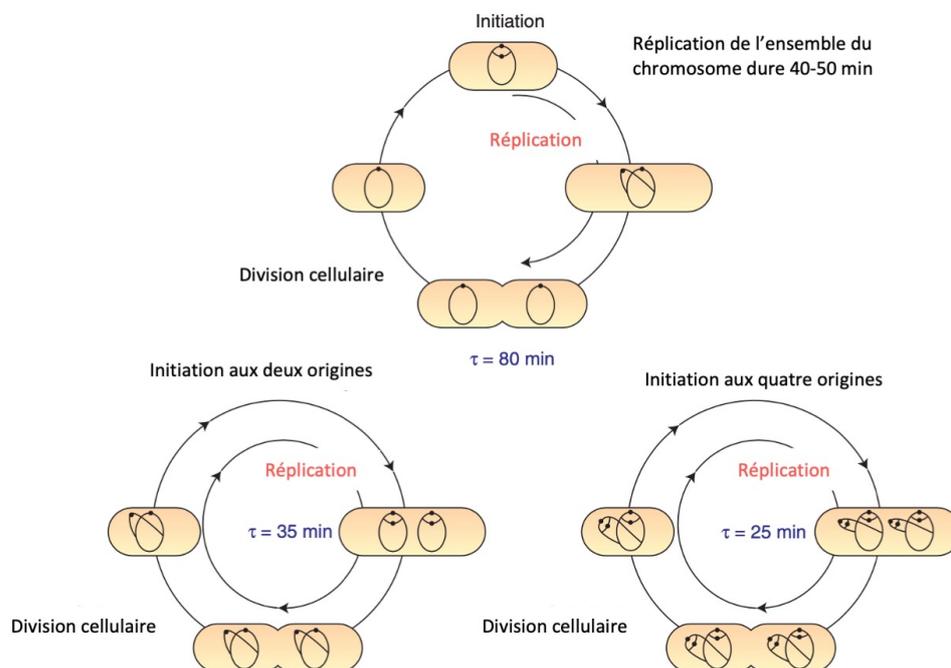


Figure 5 Cycles de réplication du chromosome d'*E. coli* selon la vitesse de croissance

Représentation du cycle de réplication du chromosome et du cycle de division cellulaire. Lorsque les cellules sont en croissance lente (dans cet exemple, le temps de doublement τ est de 80 min), la division cellulaire se produit après la réplication des chromosomes frères. Lorsque les cellules sont en croissance rapide (τ est de 35 ou 25 min), l'initiation de la réplication se produit simultanément à chaque *oriC* sur les chromosomes partiellement répliqués, et la division cellulaire se produit après que le cycle de réplication précédent ait été achevé. Figure empruntée à (Skarstad and Katayama 2013).

En condition optimale de croissance (à 37°C dans un milieu nutritif riche), les deux fourches de réplication avancent à une vitesse approximative de 1 000 nucléotides par seconde (~1kb/sec). A chaque site de réplication, l'ADN parental doit être ouvert en deux afin de pouvoir servir de brin matrice. Les matrices sont copiées simultanément. Le brin précoce, « *the leading strand* » est synthétisé continuellement. A l'inverse, le brin retardé, « *the lagging strand* » est synthétisé de façon discontinue (les fragments d'Okazaki). Le processus de réplication réalise moins d'une erreur pour 10⁹ nucléotides incorporés (van Oijen and Loparo 2010). Chaque portion nouvellement répliquée est appelée chromatide sœur. Cette vitesse importante peut être un problème pour la cellule puisqu'elle peut engendrer des collisions avec les complexes de transcription beaucoup plus lents. Les fourches de réplifications s'arrêtent donc fréquemment sur des complexes protéiques liés à l'ADN. Le système de redémarrage des fourches de réplication impliquant les protéines PriA, PriB et DnaC est essentiel pour la croissance optimale d'*E. coli*.

2.2.1 Le réplisome

L'ensemble de la machinerie de réplication est désigné sous le terme de « réplisome ». Pour former le réplisome, une succession d'étapes se met en place.

Tout d'abord, les protéines d'initiation DnaA augmentent en concentration, au fur et à mesure que la cellule croît. Puis elles s'associent avec une forte affinité aux sites « DnaA Boxes » en un complexe d'initiation de 10 à 20 protéines (Messer 2002). Les DnaA boxes servent de sites d'attachement aux protéines DnaA, permettant l'ouverture de la région DUE (Élément d'ouverture de l'ADN). Elle est composée d'une portion riche en « AT » d'environ 245 paires de bases. L'assemblage des DnaA au niveau de l'*oriC* est dynamique, c'est-à-dire qu'il y a un flux continu d'assemblage et de désassemblage de DnaA jusqu'à ce que la quantité critique d'oligomérisation de DnaA et de formation de la structure active soit atteinte. Cette notion de dynamique perpétuelle est importante pour l'ensemble des processus que nous verrons.

Ensuite, la région DUE va être envahie par les protéines de liaison simple brin ou « Single Strand Binding » (SSB), afin de l'empêcher de se refermer et permettre le recrutement du

complexe d'initiation (Wolanski et al. 2014). Les hélicases DnaB vont être chargées sur l'ADN simple brin avec l'aide des DnaA et DnaC. Les hélicases vont séparer davantage les deux brins d'ADN en portions simples brins, permettant à la primase DnaG de synthétiser de courts fragments d'acide ribonucléique (ARN) de 12-16-nt (les « *primers* »).

Enfin, ces courtes portions d'ARN autorisent l'assemblage du réplisome, qui se termine avec l'association de la pince coulissante β (« *β sliding clamp* ») et de l'ADN Polymérase III. Tout ce processus finalise l'initiation de la réplication. L'architecture du réplisome est présentée **Figure 6**.

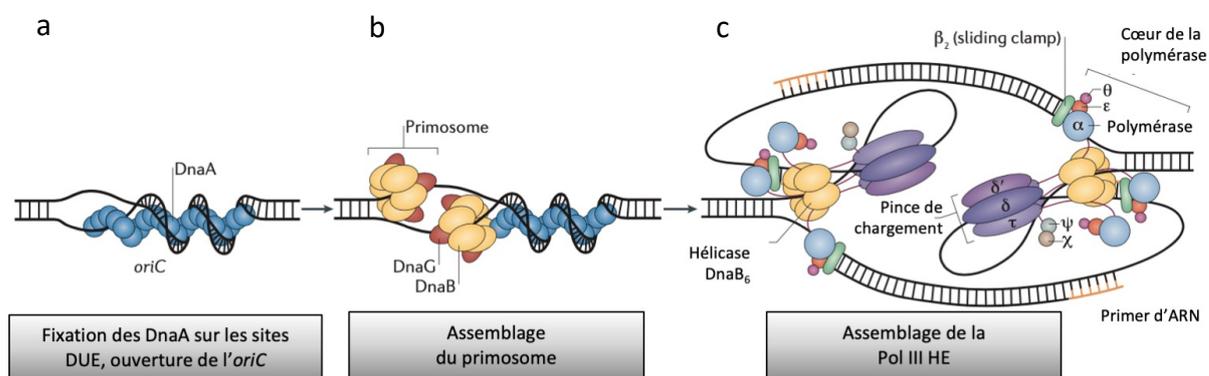


Figure 6 Représentation schématique du réplisome d'*E. coli*.

a. Représentation de la région du chromosome bactérien au niveau de son origine de réplication. Au cours de l'étape d'initiation de la réplication de l'ADN, l'ADN double brin est ouvert au site des éléments de déroulement de l'ADN (DUE) une séquence de 245 pb, par l'action de la protéine initiateur DnaA. En tordant l'ADN, une bulle d'ADN simple brin prend forme. **b.** Les complexes du primosome (DnaB-DnaG) et de l'ADN polymérase III (Pol III HE) sont assemblés complètement et forment le réplisome. **c.** Le réplisome formé avec les acteurs principaux. Figure empruntée à (Robinson and van Oijen 2013).

L'initiation de la réplication est contrôlée, et synchronisée sur l'ensemble des origines présentes dans une cellule (Skarstad 1986). Un système dirigé par le régulateur SeqA, bloque pendant un laps de temps la ré-initiation (Lu et al. 1994). Quand la cellule est en phase rapide de croissance, elle peut être dans un état de ploïdie transitoire, avec une multitude de chromosomes en division, mais l'initiation se produit simultanément à toutes les origines une fois par génération (Akerlund, Nordstrom, and Bernander 1995; Skarstad and Katayama 2013). SeqA est une protéine qui s'associe à l'*oriC*, plus exactement aux régions hémi-méthylées des sites GATC (Bergerat, Kriebardis, and Guschlbauer 1989). On parle d'ADN hémi-méthylé dès

lors qu'un seul des deux brins est méthylé. En effet, l'ADN nouvellement répliqué n'a que le brin parental de méthylé, l'autre, le sera plus tardivement par le complexe enzymatique Dam. Ce système permet à la cellule de distinguer le brin nouvellement répliqué. L'association de SeqA sur l'ADN bloque l'oligomérisation de DnaA et empêche donc la réactivation de l'initiation (Bach, Krekling, and Skarstad 2003). SeqA finit par se dissocier spontanément. Ce n'est qu'une fois que les origines de réplifications sont totalement méthylées, qu'un second événement de réplification est permis. La délétion de *seqA* a pour conséquence une ré-initiation de la réplification, ainsi qu'une perte de synchronisation des origines de réplifications présentes (Guarne et al. 2005).

La méthylation de l'ADN est utilisée pour distinguer le brin nouvellement répliqué du brin matrice. Cette reconnaissance a lieu dans le laps de temps avant la reméthylation par Dam. Il permet l'activité du système de réparation des mésappariements ou mismatch repair **(voir chapitre 4.2)**.

En l'absence de lésions d'origines exogène les mésappariements sont rares car le réplisome réplique le chromosome avec un taux d'erreur très faible, moins de 10^{-9} erreurs / base répliquée (Drake et al. 1998). En effet, la polymérase III a la capacité d'identifier un mauvais appariement de base et de resynthétiser la portion incriminée grâce à son activité de relecture « *proofreading* ».

Cependant, il arrive que le réplisome rencontre des lésions qui n'ont pas été prises en charge par des systèmes de réparations. Selon les conditions cela peut conduire soit à un arrêt de la fourche de réplification, soit à un redémarrage et à la poursuite de la synthèse en aval de la lésion (on parle de saut de lésion)(Henrikus, van Oijen, and Robinson 2018). Les deux voies conduisent à l'accumulation d'ADNs qui conduit à la réponse SOS.

2.2.2 La ségrégation du chromosome

Durant le cycle cellulaire, le chromosome suit une chorégraphie définie. La séparation des régions dupliquées s'appelle la ségrégation. Les brins dupliqués d'un même chromosome sont nommés chromatides sœurs. Les chromatides sœurs vont être à proximité pendant une période définie du cycle cellulaire.

La ségrégation des chromatides sœurs commence par la séparation des deux *oriC* qui se trouvent alignées au centre de la cellule (Wang, Reyes-Lamothe, and Sherratt 2008) avec un retard de 20% du temps de génération après le début de la réplication (Sunako, Onogi, and Hiraga 2001; Nielsen et al. 2007; Espeli, Mercier, and Boccard 2008; Lesterlin et al. 2012). Les *oriC* se positionnent précisément aux $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ de la cellule, selon le plan longitudinal (Junier, Boccard, and Espeli 2014). Le *ter* est positionné par MatP et ZapB au milieu de la cellule (Espeli et al. 2012). Puis la translocase FtsK favorise la séparation des extrémités répliquées (Stouf, Meile, and Cornet 2013).

FtsK est une ADN translocase homologue aux tubulines (Buss et al. 2015). Elle coordonne les dernières étapes de la cytokinèse et de la ségrégation des chromosomes, elle permet le positionnement précis du divisome en stabilisant la protéine de division cellulaire tardive au niveau du septum. De plus, cette protéine assure la coordination entre la ségrégation et la division des chromosomes grâce à son activité d'ADN translocase. Elle possède une extrémité N-terminale qui est impliquée dans l'assemblage de la machinerie de division cellulaire. L'extrémité C-terminale fonctionne comme un moteur qui lui permet de se mouvoir sur l'ADNdb de manière ATP-dépendante vers le site de recombinaison *dif*. Elle stimule également l'activité de la topoisomérase IV (Topo-IV) qui va permettre de finaliser le processus de séparation des deux chromosomes.

Des précaténanes se forment au fur et à mesure de la progression de la fourche de réplication par l'entrelacement des chromosomes nouvellement répliqués (formation de liens topologiques) (Wang, Reyes-Lamothe, and Sherratt 2008). L'ADN est alors enchevêtré avec lui-même, ceci, avec la formation de ponts protéiques, engendre une cohésion des chromatides sœurs. Ce phénomène de cohésion peut servir la recombinaison homologue, en la rendant plus efficace en cas de dommage à l'ADN (Vickridge et al. 2017).

Les connaissances actuelles sur la cohésion ont été principalement acquises par observation en microscopie de fluorescence, mais dorénavant une technique de recombinaison génétique le Hi-SC2 a été développée (Espinosa, Paly, and Barre 2020).

La Topo-IV va permettre de séparer les deux chromosomes répliqués en les libérant des liens topologiques et permettre ainsi la ségrégation des deux chromosomes dans les cellules filles. En effet, à la fin de la réplication, les deux ADN nouvellement répliqués sont liés comme

deux millions d'une chaîne. Ils doivent être séparés pour finaliser le processus avant la ségrégation complète (Ashley et al. 2017). La topo-IV prend en charge le traitement de l'intermédiaire tardif et la décaténation des chromosomes pour permettre la ségrégation complète des deux chromosomes répliqués. Une déficience de la Topo-IV empêche la ségrégation des loci frères nouvellement répliqués et la ségrégation des chromosomes, tandis que des augmentations modestes de Topo-IV diminuent considérablement le temps de cohésion.

Les mécanismes de ce système de ségrégation sont encore peu compris et font l'objet de discussions. L'hypothèse qu'une machinerie moléculaire prenne en charge ce phénomène, tel que cela se produit chez les eucaryotes, ou d'autres bactéries telles que *Caulobacter crescentus* (*C. crescentus*) et *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), n'a pas encore été prouvée chez *E. coli*. Le mouvement des réplisomes chez *C. crescentus*, *E. coli* et *B. subtilis*, ainsi que la ségrégation des foyers de réplication plaide contre le modèle de l'usine (voir **Figure 7**).

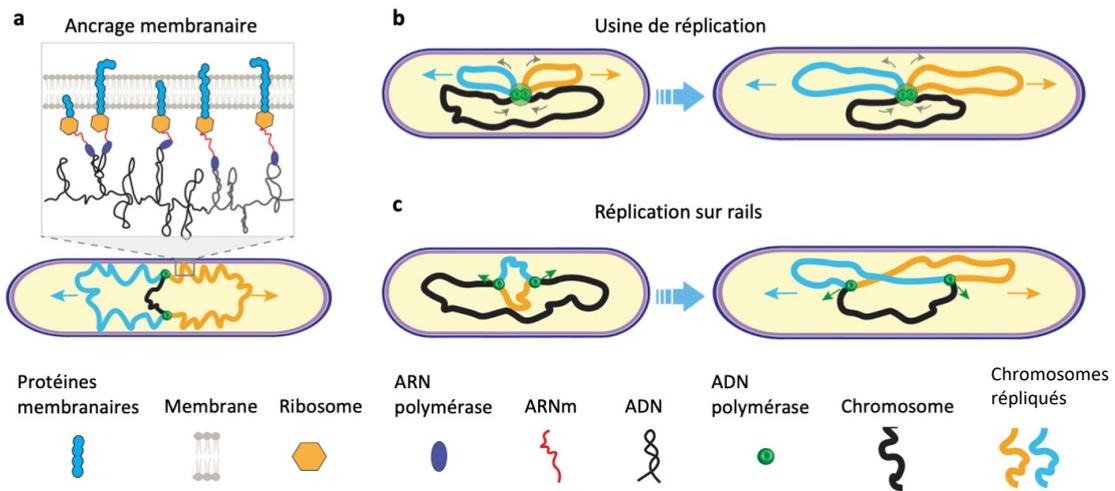


Figure 7 Modèles actualisés de la ségrégation du chromosome bactérien

a. Le modèle d'ancrage membranaire. Pendant la réplication du chromosome en noir, les réplisomes (ronds verts), et la transcription co-traductionnelle de l'ARNm ainsi que des protéines de membranes, conduisent à l'attachement des chromatides sœurs (orange et bleu) à la membrane. Une zone d'ancrage se forme sur la membrane interne (encadré). Les deux zones d'ancrage se déplacent en direction opposée. **b. Le modèle de l'usine de réplication.** Pendant la réplication, les réplisomes fixés au centre extrudent les chromatides sœurs répliquées (orange et bleu) vers les pôles opposés, tout en tirant le chromosome parental non répliqué (en noir) vers l'intérieur. **c. Le modèle de réplication sur rails.** Les deux réplisomes sont indépendants, ils se déplacent le long des bras chromosomiques séparés durant la réplication. Leur position dans la cellule est déterminée par la localisation du matériel génétique à copier. Figure empruntée à (Gogou, Japaridze, and Dekker 2021)

Il a été proposé que la ségrégation du chromosome découle principalement des propriétés physiques du chromosome bactérien, et des contraintes physiques au sein de la cellule par un effet mécanique conduisant à la libération des liens topologiques (Fisher et al. 2013). Il a été montré que les forces d'entropies, notion servant à définir l'état d'un système thermodynamique, étaient suffisantes pour cloisonner des polymères tels que des modèles chromosomiques (Jun and Mulder 2006). Une position centrale du réplisome peut également être la conséquence du déplacement des chromatides sœurs nouvellement synthétisé vers l'extérieur, tandis que le chromosome parental se déplace vers l'intérieur (Gogou, Japaridze, and Dekker 2021).

Cependant, pour réaliser la recombinaison homologue, il faut un système pour rapprocher les loci ségrégués qui va permettre d'accoler deux copies d'un même loci face à face. Ce

phénomène de rapprochement va à l'encontre des forces d'entropies qui participent à la ségrégation. C'est donc un phénomène actif et contrôlé. Il a été observé que lors de l'induction de la réponse SOS, à la suite de dommages à l'ADN, l'un des acteurs permettant ce rapprochement est la protéine RecA, plus spécifiquement les faisceaux de RecA. Ils servent de médiateur à l'appariement des homologues pendant la réparation des cassures de l'ADN (Lesterlin et al. 2014). La réponse SOS ainsi que le fonctionnement de RecA sera développé dans le chapitre « **La réponse SOS** ».

2.2.3 L'Élimination des liens topologiques est nécessaire à la ségrégation des chromatides sœurs.

L'ADN est une double hélice qui peut se sur-enrouler ou se sous-enrouler lorsque des complexes protéiques s'y accrochent et ouvrent localement la double hélice. C'est le cas des hélicases notamment celles associées aux ADN et ARN polymérase (Liu et al. 1993). A l'équilibre, le chromosome d'*E. coli* est donc globalement surenroulé négativement (Worcel and Burgi 1972) par l'action combinée des hélicases et des topoisomérases. Les topoisomérases sont des enzymes qui participent aux gestions des contraintes topologiques (voir **Figure 8**). On parle de « Linking number » (Lk) pour définir le nombre de surenroulements d'une molécule d'ADN et de densité de surenroulement σ pour comparer deux molécules. La densité de surenroulement est estimée à $\sigma = -0,06$ pour le chromosome d'*E. coli*.

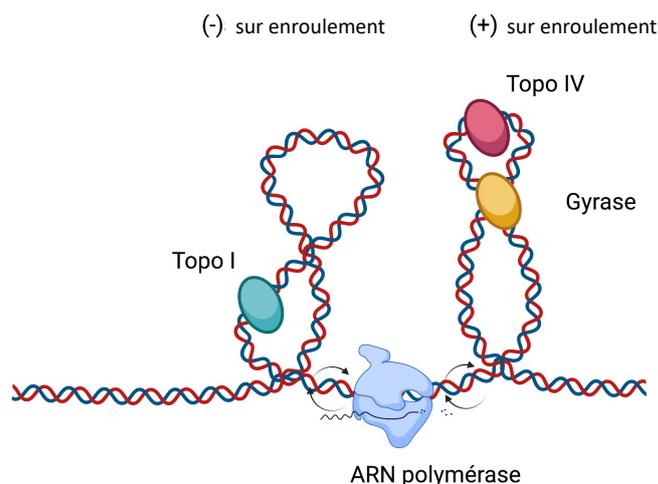


Figure 8 Représentation de l'intervention des topoisomérases

Le passage de l'ARN polymérase induit un sur-enroulement positif en amont et un sur-enroulement négatif en aval de son passage. La Gyrase (jaune) et la Topo IV (rouge) relaxent le sur-enroulement positif et la Topo I (vert) relaxe le sur-enroulement négatif.

Lors du passage de la fourche de réplication environ 100 Lk sont produits par seconde. Ils se distribuent vers l'avant de la fourche de réplication sous forme de supertours (+) et vers l'arrière sous forme de précaténanes (Postow et al. 2001) voir **Figure 9**. L'activité de l'ADN gyrase est essentielle pour permettre au réplisome d'avancer (Khodursky et al. 2000). Lorsque l'activité gyrase est réduite le système de redémarrage des fourches de réplication, PriA-DnaC, devient essentiel à la survie (Grompone et al. 2004). Une partie du surenroulement produit par la fourche de réplication est convertie en liens de caténation (précaténanes) qui lient les chromatides sœurs. L'ADN Topoisomérase III et surtout l'ADN Topoisomérase IV permettent d'éliminer ces précaténanes. L'inactivation de la TopoIV ne bloque pas les fourches de réplication (Wang, Reyes-Lamothe, and Sherratt 2008) mais conduit à une accumulation de chromosomes emmêlés et non ségrégués dans des cellules filamenteuses. Dans ces conditions, l'étape de cohésion des chromatides sœurs est prolongée à l'infini (Lesterlin et al. 2012; Joshi et al. 2013) et des cellules anucléées se forment en grand nombre.

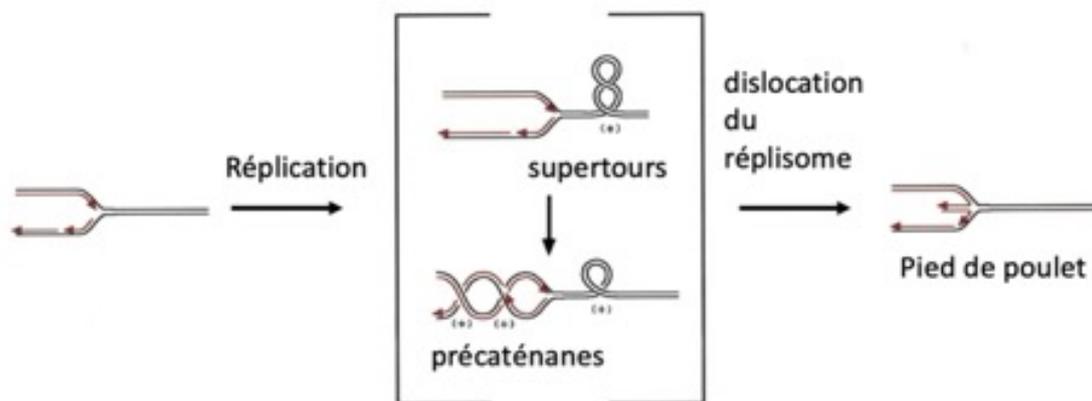


Figure 9 Formations topologiques et leurs conséquences possibles

A gauche est représentée la fourche de réplication. En noir, le brin matrice. La flèche indique la configuration 3'. Durant la réplication, la dénaturation du duplex parental cause des surenroulements positifs en amont de la fourche de réplication (molécule représentée au centre). Ils peuvent produire soit des super tours en amont de la fourche de réplication, ou des pré caténanes en aval de la fourche de réplication, selon les contraintes. Sur la droite, dans le cas où les tensions dues à la réplication ne sont pas libérées, le réplisome se disloque et peut former à la reprise une structure en pied de poulet. Figure empruntée à (Postow et al. 2001).

Malgré l'activité des topoisomérases, on estime qu'à l'issue de la réplication les deux chromosomes sont enchainés l'un à l'autre par quelques liens de caténation qui vont être spécifiquement éliminés au site *dif* sous l'action de la Topo IV (El Sayyed et al. 2016).

2.3 La division cellulaire d'*E. coli*

Lors de la division cellulaire, il y a plusieurs processus concomitants. Au-delà de la simple réplication, il y a une harmonisation des autres processus cellulaires permettant de réaliser la division. En effet, l'appareil de division doit se mettre en place pour séparer la cellule mère en deux cellules filles symétriques (cytotocinèse). La cytotocinèse commence par l'assemblage du complexe de division au centre de la cellule : le divisome. Ce complexe protéique intervient dans l'invagination de l'enveloppe cellulaire. Il y a plus d'une dizaine de protéines impliquées dans la division : FtsZ, FtsA, ZipA, FtsE, FtsX, FtsK, FtsQ, FtsL, FtsB, FtsW, FtsI, FtsN, MinCDE, MatP.

Le sujet de ma thèse n'ayant pas pour but de redéfinir les étapes de la division, je vais donc apporter les éléments qui me semblent judicieux pour comprendre cette partie du cycle cellulaire, et qui éventuellement pourra servir de socle dans la discussion ultérieure.

L'initiation de la division cellulaire est régulée par deux systèmes distincts qui se chevauchent partiellement. Premièrement, l'ancrage du *ter* permet de positionner le chromosome spécifiquement au centre de la cellule, il est contrôlé par un groupe de protéines oscillantes (MinCDE), le système Min inhibe l'assemblage de l'anneau Z aux pôles cellulaires, empêchant ainsi la génération de minicellules sans chromosome. Deuxièmement, l'occlusion du nucléoïde empêche l'assemblage de FtsZ en anneau Z sur le chromosome, par l'action de SImA.

2.3.1 L'ancrage du Ter

Le chromosome d'*E. coli* est structuré en 4 domaines distincts de taille approximative 0,75 mpb qu'on appelle les macro domaines. Ils sont définis comme des régions isolées, avec une faible interaction de contacts entre eux (Valens et al. 2004).

L'ancrage du Ter sert à positionner cette région du chromosome au centre de la cellule. Il est permis par trois protéines, MatP, ZapA et ZapB, qui relie physiquement la région Ter génomique à FtsZ par une chaîne de DNA-MatP-ZapB-ZapA-FtsZ. L'ensemble de ces interactions permettent de positionner le Ter et de favoriser l'assemblage du divisome à l'extrémité Ter (Thiel et al. 2012).

L'interaction MatP-divisome coordonne la ségrégation des chromosomes avec la division cellulaire chez *E. coli* (Espeli et al. 2012). MatP se lie spécifiquement aux sites *matS*. Les sites *matS* répétés 23 fois dans le Ter domaine sur 800 kb (Mercier et al. 2008). Un mutant de délétion de *matP*, quand il est cultivé en milieu riche, présente de graves défauts de ségrégation chromosomique et de division cellulaire. La structure en macro domaine (MD) d'*E. coli* est représentée **Figure 10**.

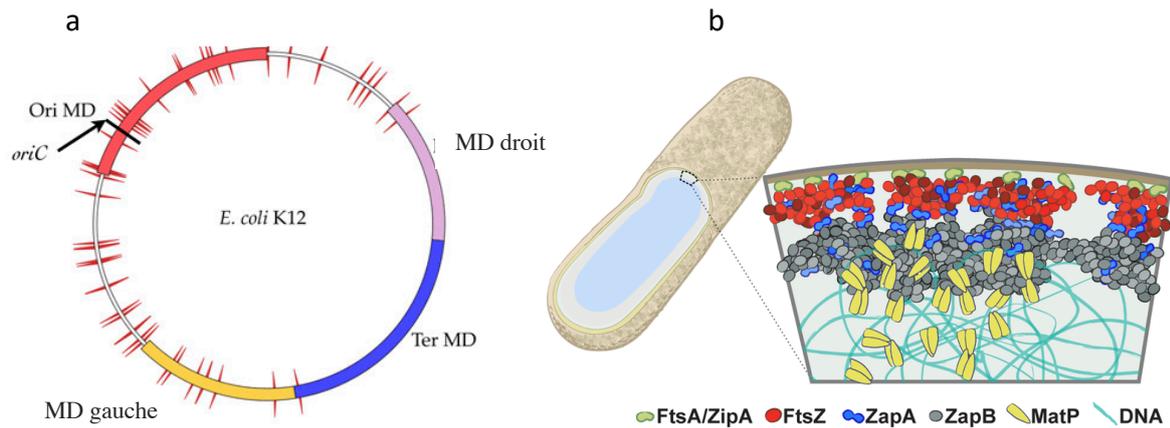


Figure 10 Structuration du chromosome en MD et organisation de l'ancrage du Ter

a. Le chromosome d'*E. coli* est composé de l' Ori (rouge), et à l'opposé le Ter, englobant le *ter* et *dif* (bleu), ainsi que la région gauche (bleu clair) et droite (jaune) encadrant les MD du Ter. Les portions blanches sont les deux régions non structurées. Les traits noirs perpendiculaires au chromosome représentent l'emplacement des d'attaches SBS de la protéine SlmA. **b.** Schéma illustrant l'arrangement radial relatif de FtsA/ZipA-FtsZ-ZapA-ZapB-MatP. FtsA (vert) et ZipA (orange) attachent la structure FtsZ (rouge) à la membrane interne. ZapA (bleu). La grande structure interne ZapB (gris) s'associe indirectement à FtsZ par l'intermédiaire de ZapA, et est ancrée sur le chromosome par ses associations avec MatP (jaune) Figure empruntée à (Buss et al. 2015).

2.3.2 Le système d'occlusion du nucléoïde

La cytokinèse est paramétrée sur un plan spatio-temporel pour ne pas produire d'aberration cellulaire (divisions asymétriques), ainsi que pour éviter de cisailer une portion du génome. Plusieurs mécanismes fonctionnent de concert avec FtsZ pour atteindre cet objectif. FtsZ permet la scission entre les deux cellules filles par la formation d'un anneau dit Z. La formation de l'anneau Z est inhibée entre autre par SlmA, SulA, MinCD (Margolin 2005).

SlmA, au centre du système, permet d'exclure FtsZ de la région du nucléoïde. Elle agit ainsi, comme un inhibiteur de la cytokinèse (Bernhardt and de Boer 2005). SlmA est associée à l'ADN chromosomique et à FtsZ, et perturbe l'assemblage des polymères de FtsZ. SlmA a des séquences de liaison à l'ADN, appelées sites SBS. Ces derniers sont dispersés sur l'ensemble du chromosome, sauf dans le Ter, empêchant la polymérisation de FtsZ dans ces régions.

SulA sert de point de contrôle en cas de dommages à l'ADN, elle est induite avec la réponse SOS et son rôle est de bloquer la division cellulaire en interagissant avec FtsZ. L'interaction SulA-FtsZ va empêcher la polymérisation de l'anneau Z (Trusca et al. 1998). Un

des intérêts de ce check point est de s'assurer de pouvoir réparer le génome en cas de dommage et de transmettre un génome viable aux cellules filles.

2.3.3 Le système Min

Dans le système Min, les protéines MinCDE inhibent la formation de l'anneau Z aux pôles de la cellule. Cela favorise sa formation au centre du plan longitudinal bactérien. MinC est également un inhibiteur de la division, en empêchant la polymérisation de FtsZ. Il oscille rapidement d'un pôle à l'autre.

Le système fonctionne de la façon suivante. MinD se lie à la membrane quand il est associé à de l'ATP. MinD confine les MinC libres aux pôles de la cellule (Raskin and de Boer 1999). MinC a une forte affinité pour MinD. MinE permet la déstructuration du complexe MinCD en stimulant l'activité ATPasique de MinD, qui se décroche. MinD forme un anneau transversal qui parcourt le long de la membrane interne. Par conséquent, les complexes MinCD se constituent alternativement à chaque pôle cellulaire, où ils sont déplacés à plusieurs reprises par MinE. La concentration de MinC la plus faible, est observée au milieu de la cellule, ce qui en fait le site préférentiel pour l'assemblage de l'anneau Z (Dewachter et al. 2018). A l'inverse, la délétion de ces protéines conduit à la formation de l'anneau Z aux pôles et à une division asymétrique produisant, par conséquent, une mini cellule sans ADN et une cellule plus grande. Les deux derniers systèmes que nous venons de décrire, sont repris par la **Figure 11**.

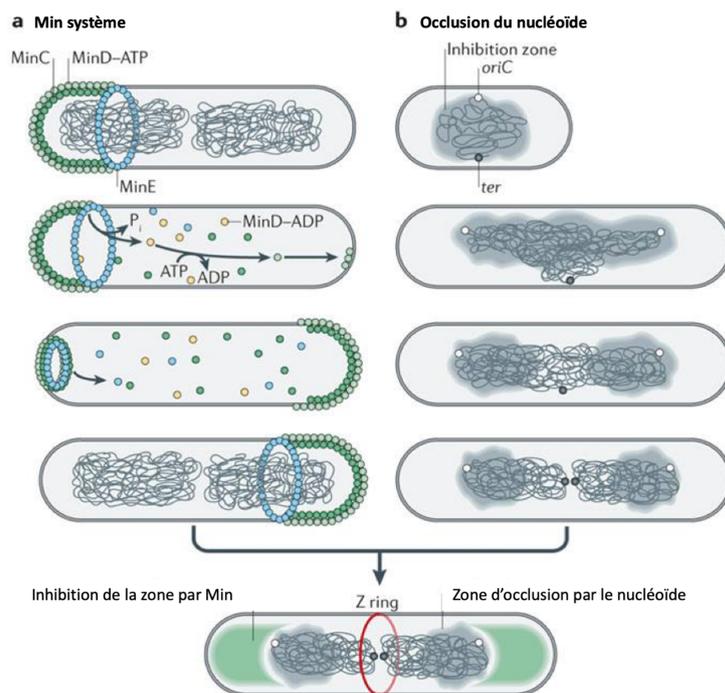


Figure 11 Le système MinCD et l'occlusion du nucléoïde

a. Représentation du système Min. L'ADN en gris et le *ter* (cercle gris foncé), l'*oriC* (cercle blanc). MinC (cercle vert) et MinD (cercle jaune clair) forment un complexe à un pôle cellulaire et stimulent la dépolymérisation des protofilaments FtsZ. MinE (cercle bleu) se lie à MinCD pour briser le complexe. Les monomères de MinC, MinD et MinE diffusent alors vers l'autre pôle cellulaire, créant un gradient oscillatoire. La concentration la plus faible de MinCD se trouve au niveau du futur septum permettant ainsi la polymérisation de FtsZ et la formation de l'anneau Z (Z ring). **b. L'occlusion du nucléoïde.** SlmA liée aux séquences SBS (nuage gris foncé) est répartie dans tout le génome sauf dans la région du Ter. En dehors du Ter, SlmA stimule la dépolymérisation de FtsZ (en bas à gauche). L'association des deux systèmes permet avec le système Min, la formation de l'anneau Z au centre de la cellule.

2.3.4 La cytocinèse

FtsZ est la protéine centrale à la cytocinèse. Cette protéine est une homologue aux tubulines. Les tubulines chez les eucaryotes ont pour fonctions de servir d'échafaudages, de voies de transports, et de cytosquelette. FtsZ quant à elle, permet la formation d'une structure contractile en anneau : l'anneau Z (Buss et al. 2015). L'anneau Z se forme au niveau du futur site de division cellulaire. Il contrôle le moment et le lieu de la division (Margolin 2005; Burby and Simmons 2020). Il sert également d'échafaudage pour le recrutement des autres protéines formant le divisome. Les étapes de la formation du septum par FtsZ sont décrites **Figure 12.**

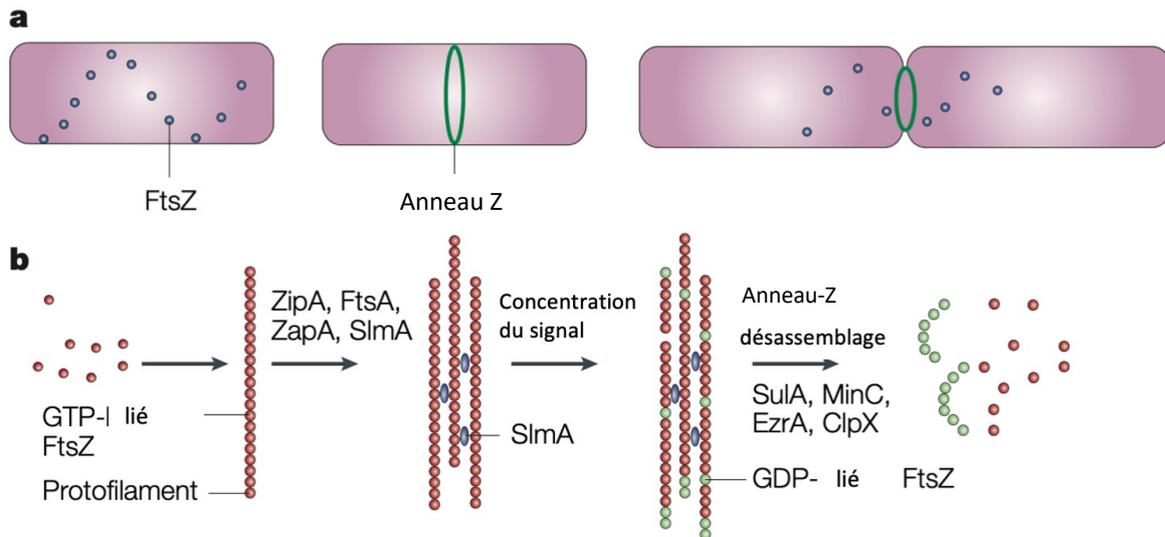


Figure 12 Étapes de la formation de l'anneau Z

a. Sur le schéma de gauche, une cellule fille *E. coli* sans anneau Z, avec des protéines FtsZ libres. S'en suit sur schéma centrale la formation de l'anneau Z, et sur le schéma de droite la division par sa contraction. **b. Le modèle des étapes successives de la formation de l'anneau Z.** Les points rouges indiquent les liens GTP-FtsZ en dimers qui s'assemblent en protofilament. L'hydrolyse du GTP en GDP est renouvelée par l'abondance de GTP dans la cellule. Plusieurs protéines telles que, ZipA, ZapA, probablement FtsA, ainsi que la protéine d'occlusion du nucléoïde SlmA (bleue), regroupent ces protofilaments et les ancrent à la membrane cytoplasmique. Un signal déclenche la contraction de l'anneau puis son désassemblage. Le GDP situé aux extrémités des protofilaments (en vert), entraîne la formation de protofilaments. Les FtsZ libre forme alors une spirale dans la cellule afin de former un nouvel anneau dans les cellules filles. La concentration élevée de protéines inhibitrices telles que SulA, MinC, ClpX, pourrait contrer les protéines stabilisatrices de l'anneau et promouvoir le désassemblage.

Après l'initiation de la constriction, la membrane interne s'invagine, c'est la séptation qui est le processus final de formation de la paroi transversale entre deux cellules filles, dépendant de FtsZ.

Chez *E. coli*, la réplication et la division sont des processus découplés. En effet, Gullbrand et Nordstrom ont démontré dans qu'une culture d'*E. coli* en phase stationnaire, les cellules contenant plus d'un chromosome peuvent se diviser quelque temps après la reprise de la croissance, dans des conditions ne permettant pas l'initiation de la réplication des chromosomes (Gullbrand and Nordstrom 2000). La division n'est donc pas requise à la suite de l'initiation de la réplication. L'inverse est également vrai, la poursuite de la croissance sans initiation de la réplication résulte en des cellules filamenteuses. C'est ce qui est observé à la

suite d'un stress génotoxique où les cellules ne se divisent plus mais continuent à croître et filamentant.

J'ai détaillé un ensemble de processus qui permet de comprendre une partie du cycle de vie d'*E. coli*. Qu'en est-il de sa capacité de survie face à des événements qui peuvent altérer l'intégrité de son ADN ?

3 Les antibiotiques affectant l'intégrité de l'ADN

L'habilité des bactéries à réparer leur ADN est essentielle pour leur survie. Si on considère l'ensemble des cycles de transmission, d'inoculation et d'infection des souches pathogènes, celles-ci peuvent être exposées successivement à diverses conditions environnementales : au rayonnement ultraviolet, à la dessiccation, aux sécrétions de l'hôte. Une fois dans l'hôte, elles doivent se maintenir face à d'autres communautés bactériennes et se défendre contre le système immunitaire. Les bactéries sont donc exposées à de nombreuses conditions exogènes qui peuvent altérer la structure de l'ADN, et y produire divers types de lésions.

Les antibiotiques naturels sont des composés chimiques produits par certains microorganismes et sécrétés dans l'environnement. Un avantage sélectif fort apparaît pour les producteurs de ces composés dans la compétition territoriale et l'accès aux ressources nutritives. Par ailleurs, les organismes producteurs se prémunissent de leurs effets. Les gènes impliqués dans cette immunisation et la biosynthèse sont souvent organisés en opéron.

Un nombre croissant de gènes de résistance aux antibiotiques ont été identifiés durant ces dernières dizaines d'années, beaucoup de ces gènes de résistance ont été acquis par transfert de gènes horizontaux. Faisant partie du microbiote intestinal, les diverses souches d'*E. coli* ont un rôle central comme donneur et accepteur de gènes de résistance. *Escherichia coli* est donc un vecteur de propagation de gènes de résistance pour des bactéries pathogènes (Poirel et al. 2018).

Il existe plusieurs familles d'antibiotiques qui diffèrent par leur spectre d'activité et leur structure chimique. Les antibiotiques ciblent les fonctions essentielles à la multiplication des bactéries : la transcription, la traduction, la synthèse de l'enveloppe ou la réplication de l'ADN.

Les aminoglycosides interfèrent avec la traduction, et sont efficaces contre un large éventail de bactéries, aussi bien Gram-négatives que Gram-positives. Ce sont des bactéricides qui ciblent le ribosome bactérien, ils se fixent sur le site accepteur des ARN de transfert de la sous-unité 50S. Par ce moyen, les aminoglycosides perturbent la synthèse des protéines.

A l'inverse, les Beta-lactames inhibent la synthèse du peptidoglycane en se fixant aux protéines de liaison des pénicillines. Les résistances aux bêta-lactamines peuvent venir de la production d'enzyme de dégradation : les bêta-lactamases, mais aussi d'une diminution de la perméabilité de la membrane externe aux antibiotiques hydrophiles par modification des porines ou des phénomènes d'efflux.

Les rifampicines ciblent généralement l'ARN polymérase et rend impossible l'élongation du transcrit d'ARN. Les résistances à la rifampicine viennent de mutation de l'ARN polymérase ou de pompes à efflux.

Dans les paragraphes suivants nous allons voir que certains antibiotiques peuvent endommager l'ADN des bactéries qui devront solliciter leurs machineries de réparation pour survivre. La réplication peut être altérée par différents types d'antibiotiques comme les quinolones et les coumarines qui ciblent les topoisomérases. En les inhibant ou en les bloquant sur l'ADN, ces antibiotiques empêchent la progression du réplisome. La mitomycine-C et la bléomycine sont, elles, génotoxiques, elles s'associent fortement à l'ADN pour le modifier, le tordre, empêcher son ouverture ou le casser.

3.1 Les quinolones et les coumarines

Les quinolones sont connues pour être bactéricides et peuvent agir sur toutes les bactéries. Elles forment un complexe covalent entre l'ADN et les topoisomérases de type II (Gyrase et Topoisomérase IV) lors du passage de brin à travers la cassure double brin de l'ADN de la réaction de relaxation ou de surenroulement. Les topoisomérases sont ainsi pétrifiées sur l'ADN et forment un barrage à la progression du réplisome (Hiasa, Yousef, and Marians 1996). La mort cellulaire interviendrait lorsque les processus de réparation n'arrivent pas à éliminer la topoisomérase pétrifiée et qu'une cassure double brin de l'ADN est créé (Khodursky and Cozzarelli 1998). Les topoisomérases peuvent également être inactivées par les coumarines, mais dans ce cas c'est l'activité ATPase portée par les sous unités β de la

Gyrase ou de la TopoIV qui sont les cibles. Cette inactivation provoque l'arrêt de la réplication (Khodursky et al. 2000). A doses sub-létales, les quinolones et les coumarines provoquent en outre une profonde modification du transcriptome puisque l'expression des gènes est dépendante du niveau de surenroulement (Peter et al. 2004). Il n'existe pas, à ce jour, d'antibiotique ou de drogue synthétique qui inhibe les Topoisomérases I et III d'*E. coli*.

La résistance à ces agents antimicrobiens est généralement due à des mutations dans les cibles du médicament, à savoir les gènes de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV (Jacoby 2005), mais d'autres mécanismes tels que la perméabilité réduite de la membrane externe, la protection des structures cibles ou une modification de la régulation des pompes d'efflux (Jacoby 2005) peuvent être en cause. Les pompes à efflux sont des transporteurs protéiques localisés dans la membrane cytoplasmique. Ce sont des transporteurs actifs, qui ont besoin d'une source d'énergie chimique pour remplir leur fonction.

Sur le même principe que les quinolones, de nombreuses molécules anticancéreuses ciblent les Topoisomérases humaines (Delgado et al. 2018). Parmi celles-ci la camptothécine (produite par des végétaux), le Topotecan ou l'irinotecan bloque la Topoisomérase I. Les etoposides, la doxorubicin (également antibiotique) ou les ICRF bloquent les Topoisomérases de types II. Les cassures double brins générées par l'empoisonnement des topoisomérases par ces molécules sont à l'origine de l'activité antitumorale.

3.2 Les antibiotiques et agents anti cancéreux

Certains antibiotiques interfèrent directement ou indirectement avec la réplication du génome et peuvent provoquer des lésions de l'ADN. On les classe dans la catégorie des antibiotiques génotoxiques. Cette propriété en fait de potentiels agents anti tumoraux car ils agissent en produisant des lésions excessives de l'ADN provoquant la mort cellulaire directement ou après la réplication de l'ADN. La survie est favorisée par la réparation de ces lésions par un certain nombre de voies de réparation. L'efficacité des médicaments anticancéreux est fortement influencée par la capacité cellulaire à réparer l'ADN (Helleday et al. 2008).

La bléomycine et la mitomycine-C, deux antibiotiques avec des propriétés génotoxiques, ont ainsi été abondamment utilisés en chimiothérapie (Chen and Stubbe 2005). Actuellement, il est de plus en plus envisagé de repositionner différents antibiotiques génotoxiques comme médicaments anti cancéreux (Yadav and Talwar 2019). Paradoxalement, les antibiotiques génotoxiques peuvent également avoir des propriétés mutagènes chez les bactéries cibles. Par exemple, l'emploi de MMC chez *E. coli* conduit très spécifiquement à des transversions G-C → T-A (Lopes-Kulishev et al. 2015): chez les cellules humaines elles pourraient ainsi favoriser l'apparition de cancers. Une méta analyse a conclu récemment que l'augmentation de cancer pour les personnes prenant des antibiotiques était de 18% (Petrelli et al. 2019).

Le développement tumoral peut être associé à une perturbation des voies de réponse et de réparation des lésions de l'ADN. Cette perturbation entraîne une réduction de la capacité de réparation de l'ADN et une instabilité génétique accrue dans les cellules tumorales. Les défauts d'une voie de réparation de l'ADN peuvent être compensés par d'autres voies. Ces voies de compensation peuvent être identifiées dans des cribles de létalité synthétique et ensuite ciblées spécifiquement pour le traitement des tumeurs défectueuses dans la réparation de l'ADN.

3.3 La bléomycine : découverte et intérêts thérapeutiques

A la suite de recherches d'antibiotiques produits par les *Streptomyces*, la bléomycine (BLM) a été découverte dans les années 1956 par Maeda *et al.* La BLM a été officiellement isolée en 1966 par la même équipe à partir de *Streptomyces verticillus*, une bactérie gram-positive (Umezawa *et al.* 1966). A cette époque, les effets identifiés étaient l'inhibition de la synthèse de l'ADN et des protéines (Suzuki *et al.* 1968). Son activité a été principalement étudiée sur *E. coli* et sur des cellules des cellules tumorales Hela.

En 1967, les propriétés anticancéreuses de la BLM ont été découvertes (Umezawa *et al.* 1967). De nos jours, elle est utilisée dans les traitements de chimiothérapie contre les cancers des testicules, de la peau (carcinomes spinocellulaires), et les lymphomes malins de la tête et du cou. En comparaison à d'autres agents anti-cancéreux, la BLM a pour intérêt de provoquer de légères immunosuppression et myélosuppression.

3.3.1 Bléomycine : propriétés moléculaires

La BLM appartient à une famille de glycopeptides solubles dans l'eau, de structures complexes. Ces molécules ont une base commune, elles sont toutes composées de 1-gulose, 3-O-carbomoly-D-mannose, de 5 acides aminés et d'une amine. La formule chimique de base pour la bléomycine acide est $(C_{50}H_{72}N_{16}O_{22}S_2)$ (**Figure 13 a**). Ces molécules ne sont pas capables de traverser les membranes cellulaires par simple diffusion du fait de leur nature lipophile. La queue positivement chargée (**Figure 13 b**) semble permettre leur prise en charge par des canaux transporteurs (Chen and Stubbe 2005). Chez *Mycobacterium tuberculosis* des transporteurs ABC permettent l'import de la BLM (Rempel et al. 2020). Chez *E. coli*, SbmA fait partie des transporteurs pouvant importer la BLM (Domenech et al. 2009; Paulsen et al. 2016)

Quand la BLM est maturée par une succession de réactions chimiques, tel que décrit **Figure 14**, elle a la particularité d'induire des lésions oxydatives à l'ADN.

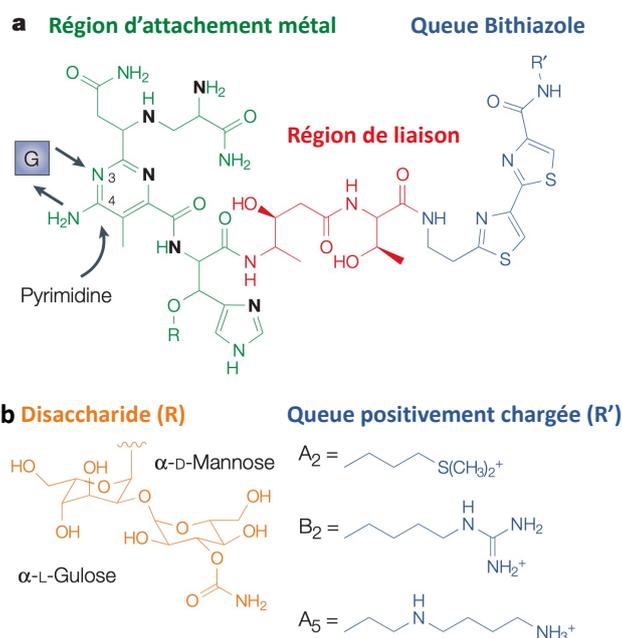


Figure 13 Structure de la métallobléomycine et ses domaines d'organisation.

a. Structure de la bléomycine. Le domaine de liaison au métal, essentiel pour induire les cassures doubles brins (en vert) et l'atome de nitrogène qui permet l'association au métal (noir). La région servant de lien, est en rouge et la queue bithiazole en bleu. **b.** Le disaccharide (R) et des exemples de la queue positivement chargée (R'). Figure empruntée à : (Chen and Stubbe 2005)»

L'activité de la BLM est dépendante de la composition du milieu (Suzuki et al. 1968). Pour être active, elle a besoin de se lier transitoirement à des cofacteurs tels que : des ions ferreux (Fe(II)) ou cuivreux Cu(II)), de l'oxygène, et être en présence de composés réducteurs (Figure 14).

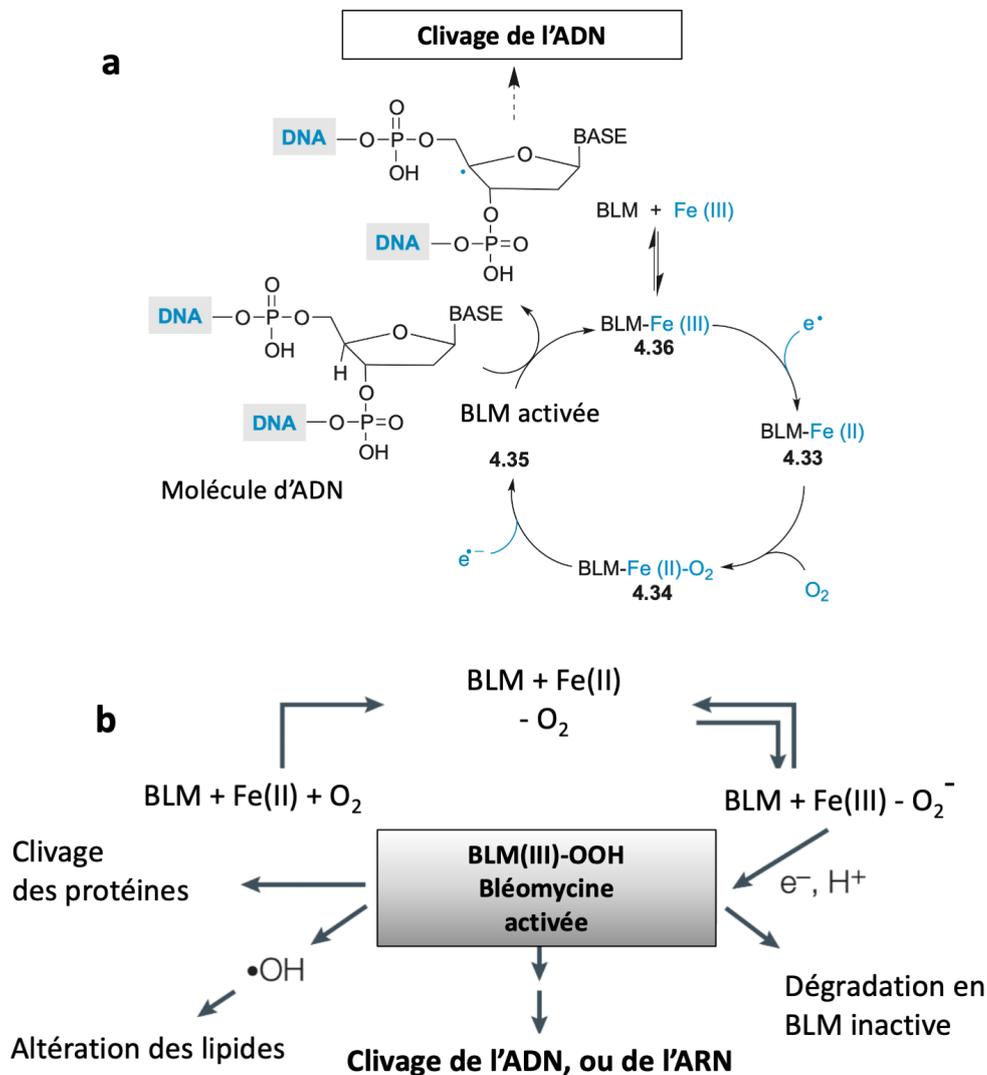


Figure 14 Formation de la forme « activée » de la bléomycine et ses conséquences.

a. Cycle de réduction de la BLM. Le principal mécanisme d'action de la BLM est la production de cassures doubles ou simple brin à l'ADN. Le phénomène est initié par la séparation d'un désoxyribose d'un de ses hydrogènes. L'espèce directement responsable de l'élimination de cet atome d'hydrogène est un complexe de BLM "activé" 4.35, résultant de la réduction par un électron du complexe ternaire BLM-Fe(II)-oxygène. L'électron peut provenir de réducteurs externes tels que l'acide ascorbique ou les thiols ou d'une autre molécule de 4.34, qui serait alors transformée en une espèce Fe(III) inactive 4.36. La réaction de 4.35 avec l'ADN implique l'ablation de l'hydrogène du ribose. Enfin, la 4.33 peut être régénérée à partir de la 4.36 par un système enzymatique dépendant du NADH ou par réduction de thiols, créant ainsi un processus cyclique. De très petites quantités pénètrent dans les cellules tumorales en raison de sa faible lipophilie. **b.** La forme activée de la bléomycine peut être formée par son association à du Fe(II), suivit par celle d'un oxygène et un élément réducteur. La BLM peut cliver les protéines, altérer les lipides, ou s'attaquer à l'ADN / ARN. Figure adaptée de : « Bleomycins : towards better therapeutics » Nature review 2005.

En fonction de la disponibilité en dioxygène, la BLM va pouvoir générer différents types d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), comme des radicaux superoxydes (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les radicaux hydroxyles (OH^\cdot). Ils altèrent la structure des lipides, fragmentent les protéines, ainsi que l'ADN et les ARN. De plus, le superoxyde entraîne la libération d'ions fer libres à partir de protéines contenant du fer (les protéines avec cluster Fe-S). Le fer peut également se localiser le long du squelette phospho-diester des acides nucléiques. En outre, une forte concentration d'ions ferreux libres entraîne la production de radicaux hydroxyles (OH^\cdot) par la réaction de Fenton (Imlay 2003). À terme, ces réactions peuvent induire des CDB.

Les études *in vivo* ont montré que la BLM n'inhibait pas directement la réplication de l'ADN, la synthèse de l'ARN, ou la synthèse des protéines. En fait, elle génère des sites abasiques, ou induit des cassures simples brins et des cassures doubles brins, pouvant provoquer des réarrangements chromosomiques, ou aller jusqu'à fragmenter le chromosome (Vig and Lewis 1978). Des études complémentaires ont montré qu'elle pouvait de plus cliver les ARN de transfert (Magliozzo, Peisach, and Ciriolo 1989). Les dommages vont cibler préférentiellement le sucre de l'ADN (l'anneau furanose) (Burger, Peisach, and Horwitz 1981). Le radical engendré est un atome, ou un groupe d'atomes, avec au moins un électron non apparié. Cette caractéristique rend le radical très réactif chimiquement.

La BLM, s'intercale d'abord entre deux brins d'ADN, puis dénature une séquence spécifique de pyrimidine (Py) /guanine (Py: T ou C)3' et 5'(G-Py)3' (Vig and Lewis 1978). Selon les séquences de l'ADN, entre 1/3 et 1/20 des lésions produites sont des cassures doubles brins qui peuvent être de deux natures distinctes : soit venant de deux cassures simples brins en face l'une de l'autre, soit la transformation d'une cassure simple brin en double brin par le passage de la fourche de réplication. Des études *in vitro* ont montré que la BLM pouvait cliver les ARNt (Magliozzo, Peisach, and Ciriolo 1989; Holmes et al. 1997). Cela a également été confirmé *in vivo* (Holmes et al. 1997), et même dans certains cas sans présence d'ions métallique pour l'ARNt^{Phe} (Keck and Hecht 1995). De plus la BLM cible les ARN, contribuant ainsi à l'inhibition de la synthèse protéique (Abraham et al. 2003).

A faible concentration d'oxygène, ce sont majoritairement des sites abasiques qui vont être générés par oxydation. En aérobiose, ce sont des cassures simple brin et double brins qui vont être privilégiées (Chen and Stubbe 2005).

La plupart des modèles développés viennent d'études biochimiques sur de l'ADN purifié. La réponse cellulaire à un traitement à la BLM est complexe, et chez les eucaryotes elle est dépendante de la lignée cellulaire, ainsi que du génotype. Bien que les modèles de mammifères soient nécessaires d'un point de vue médical à l'étude de la toxicité à l'échelle d'un organisme, l'étude sur la bactérie est complémentaire et permet d'étudier finement et rapidement, sur un ensemble de mutant les implications des systèmes de réparations.

Chez les bactéries, la nécessité d'avoir des enzymes spécifiques à la réparation des CDB, conforte l'hypothèse selon laquelle les CDB sont la cause principale de la cytotoxicité de la BLM à 37°C, sous agitation en milieu riche. Enfin, on note une sensibilité aiguë des *E. coli recN* à la BLM, comparable à celle des cellules *recA*, ce qui implique un rôle central de la protéine RecN dans la réparation des lésions (Kosa et al. 2004).

3.3.2 Résistance endogène à la bléomycine chez *Streptomyces*.

Chez les producteurs de BLM, *actinomycètes*, le gène *ble* produit un peptide associé qui inactive l'effet BLM dans la cellule (Gatignol, Durand, and Tiraby 1988). Cette résistance s'est propagée aux bactéries qui ne produisent pas de BLM, et les gènes conférant cette résistance ont été identifiés dans un transposon : Tn5 des bactéries gram-négatives ou un plasmide pUB110 des bactéries gram-positives (Mori et al. 2008). Un autre gène sert à se prémunir de l'effet de la BLM, le gène *sbmA*, qui code pour un transporteur ABC (Domenech et al. 2009; Paulsen et al. 2016).

3.4 La Mitomycine-C découverte et intérêts thérapeutiques

Les mitomycines et les porfiromycines forment un groupe d'antibiotiques bactéricides et cytotoxiques étroitement liés, produits par plusieurs espèces de *Streptomyces* (Szybalski and Iyer 1964).

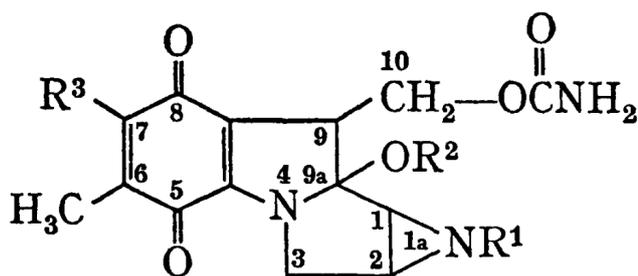
La mitomycine-C (MMC), utilisée de nos jours comme agent chimio thérapeutique, a été découverte pour son action antibiotique. Cette substance a été isolée à partir d'une bactérie vivant dans les sols au Japon : *Streptomyces caespitosus*. La substance a été identifiée par spectrométrie de masse en 1956 (Hata et al. 1956). Beaucoup de recherches ont été réalisées afin de comprendre et de limiter ses effets néfastes permettant son utilisation thérapeutique. Seules certaines études montraient une activité sur le sarcome ostéogénique, néanmoins, les chercheurs japonais ont continués à étudier cette molécule sur une variété de tumeurs malignes (Crooke and Bradner 1976). En 1966, une révision des schémas posologiques et une surveillance hématologique plus étroite ont permis d'améliorer l'efficacité et de réduire la toxicité. C'est en 1974 que la MMC est finalement commercialisée aux États-Unis. Parmi les différentes mitomycine, la MMC est la molécule la plus efficace, présentant un large spectre d'activité contre les tumeurs transplantées mais moins d'activité contre certaines tumeurs spontanées (Crooke and Bradner 1976).

3.4.1 Mitomycine-C : propriétés moléculaires

La MMC est un agent alkylant qui pur, se présente sous la forme d'un cristal bleu violet. Un agent alkylant est un composé électrophile réactif qui peut réagir avec les fractions nucléophiles des molécules organiques, telles que les bases de l'ADN. La MMC est généralement non-réactive quand elle se retrouve naturellement oxydée, mais devient très réactive au sein de la cellule: après réduction chimique ou enzymatique, suivie par la perte du groupement hydroxyle, et la formation d'un indole aromatique (Iyer and Szybalski 1964). Ainsi activée, elle se lie de manière covalente aux atomes riches en électrons des bases de l'ADN (oxygène, azote). Plus spécifiquement, ce sont les paires guanines et cytosines qui vont subir la formation d'un pont covalent entre elles. Le schéma d'alkylation dépend de l'agent (monofonctionnels, bifonctionnels pour la MMC), de la position dans l'ADN/ARN, et est différent dans les acides nucléiques à simple brin et à double brin.

Les alkylations de base sont à la fois génotoxiques et cytotoxiques (Szybalski and Iyer 1964; Drablos et al. 2004).

La formule chimique de la MMC est ($C_{15}H_{18}N_4O_5$), sa structure chimique est présentée **Figure 15**. Le groupement alkyle est un alcane (de formule C_nH_{2n+2}) avec un hydrogène en moins. Les alkyles sont des radicaux instables.



	R1	R2	R3
Mitomycine A	H	CH ₃	H ₃ CO
Mitomycine B	CH ₃	H	H ₃ CO
Mitomycine A	H	CH ₃	H ₂ N
Porfiromycin (N-methyl-mitomycine C)	CH ₃	CH ₃	H ₂ N

Figure 15 Structure chimique des mitomycines

La mitomycine a une structure commune avec plusieurs radicaux variables. Figure empruntée à : (Szybalski and Iyer 1964) .

La MMC est relativement inerte et nécessite une réduction chimique ou enzymatique de son cycle quinone pour initier l'alkylation (Noll, Mason, and Miller 2006). Un cycle quinone est un composé organique composé d'une tête polaire réductrice couplée à une chaîne latérale lipidique qui varie en longueur et en degré de saturation. Les quinones fonctionnent principalement comme des transporteurs d'électrons.

Son activation au sein de la cellule est dépendante du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH pour la forme réduite), mais peut être réalisée *in vitro* en

présence de sodium hydrosulfite (Crooke and Bradner 1976). Lorsque la MMC est activée par réduction, elle peut réagir avec de nombreux composants cellulaires. Quand elle réagit avec l'ADN, il y a création de liaisons covalentes entre deux brins opposés (Iyer and Szybalski 1963). Cette action est dépendante de la séquence, deux guanines, l'une en face de l'autre, vont être liées par une liaison covalente, voir **Figure 16**.

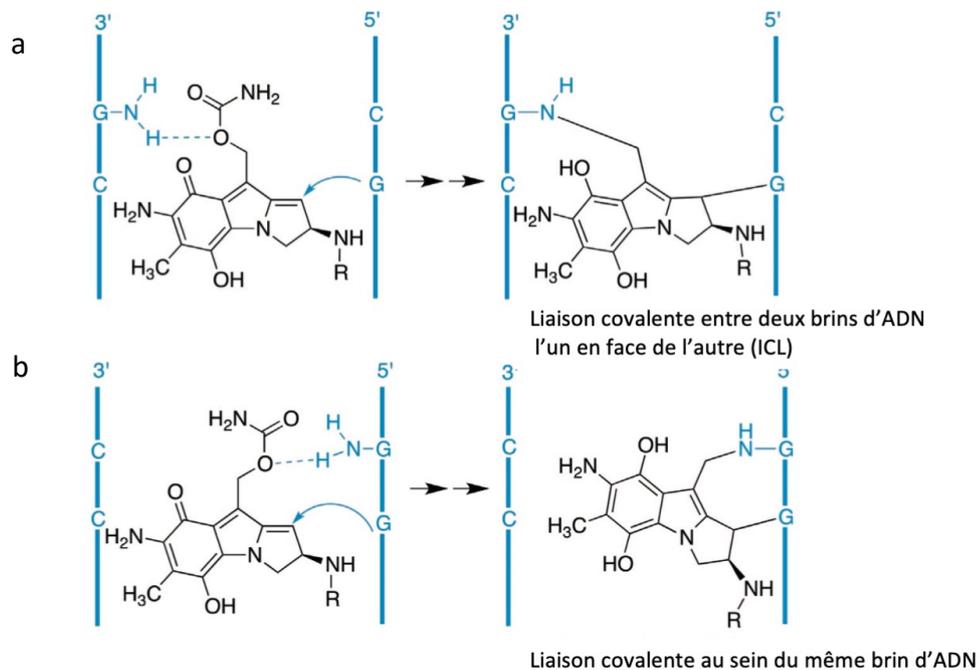


Figure 16 Type d'adduits pouvant être produits

a. Formation d'une liaison covalente à partir d'un agent alkylant entre deux brins opposés d'ADN, à la suite de la MMC. b. Formation d'une liaison covalente à partir d'un agent alkylant sur le même brin. Figure empruntée à : (Avendaño and Menéndez 2015).

Le mécanisme principal de l'activation de la MMC est l'activation par bio-réduction, conduisant à l'espèce chimique cytotoxique voir **Figure 17**. La bio-réduction *in vivo* se fait d'autant plus efficacement en condition anaérobie (Verweij and Pinedo 1990).

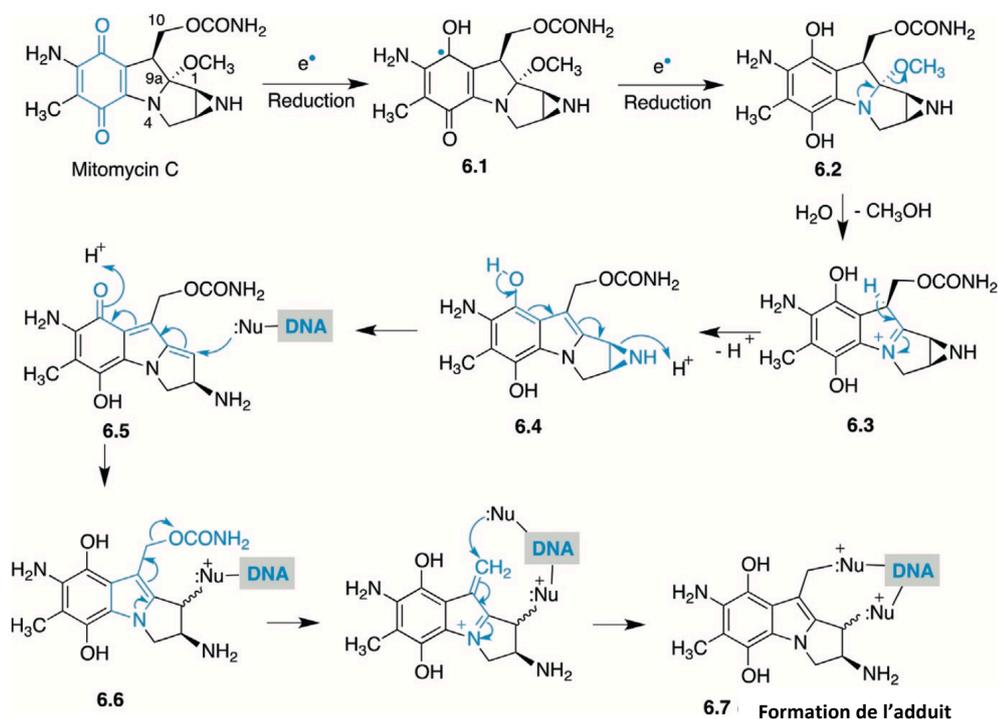


Figure 17 Les différentes étapes menant à l'activation de la MMC *in vivo*

La maturation de la MMC commence par deux étapes de réduction consécutives, pour obtenir la semi-quinone correspondante 6.1 puis de l'hydroquinone 6.2. Les deux formes peuvent initier la cascade de réactions conduisant à l'alkylation de l'ADN, mais les études indiquent que l'hydroquinone est l'espèce active (Avendaño and Menéndez 2015). L'élimination spontanée du méthanol de l'hydroquinone 6.2 donne le dérivé iminium 6.3. Le dérivé indole 6.4, formé par déprotonation de 6.3, contient deux groupes, à savoir le cycle aziridine et le carbamate. La protonation de l'azote de l'aziridine de 6.4 et l'élimination suivante avec ouverture concomitante du cycle aziridine donne le méthide de quinone 6.5. Cet intermédiaire hautement réactif contient une position électrophile qui réagit avec les groupes nucléophiles de l'ADN par une réaction de type Michael pour donner l'intermédiaire instable 6.6. Cette réaction a une spécificité de séquences dans le sillon mineur. La plupart des événements d'alkylation dus à la MMC sont des mono-alkylations, mais dans certains cas, l'élimination du groupe carbamate génère une espèce d'iminium électrophile, qui subit une seconde alkylation par attaque d'un groupe 2-amino de la guanine et conduit à un lien covalent dans l'ADN 6.7 Figure empruntée à (Avendaño and Menéndez 2015).

Il a été démontré que la MMC se lie à l'ADN à la fois *in vitro* et *in vivo* (Goldberg 1965). L'alkylation de l'ADN par la mitomycine a lieu au niveau du petit sillon, comme le montre la **Figure 18**. Aussi bien des liaisons covalentes inter- et intra-brin ont été observées, bien que les premières soit prédominantes. Elles sont respectivement spécifiques, aux séquences 5'-CG-3' et 5'-GG-3'. Cette liaison dans le petit sillon a pour conséquence de modifier la conformation de l'ADN (Tomasz et al. 1983), de bloquer la fourche de réplication (Smeaton et al. 2009; Noll, Mason, and Miller 2006) puis éventuellement de générer des cassures doubles brins. La fragmentation de l'ADN dans les cellules exposées à la MMC, est dépendante de la présence d'ions magnésium et de la température, et conduit à la formation de mono-nucléotides et de sites abasiques (Webb 1962). Des effets mutagéniques ont été rapportés par la même équipe (Gause 1963). La MMC est également capable de provoquer des échanges chromosomiques chez les leucocytes et ultimement d'entraîner la fragmentation du chromosome (Crooke and Bradner 1976; Verweij and Pinedo 1990).

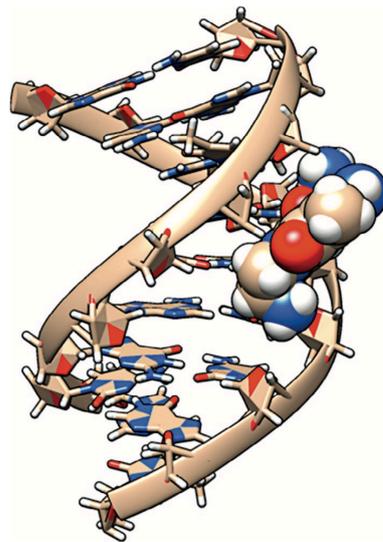


Figure 18 Structure d'un complexe mitomycine C-ADN monoalkylé.

Représentation de l'ADN en double hélice, complexé avec une molécule de MMC. Générée à partir de la référence 199d de la protéine Data Bank et affichée avec Chimera Figure empruntée à (Avenidaño and Menéndez 2015).

En 1966, des expériences menées chez *E. coli* sur des cultures en croissance exponentielle ont permis d'observer, pendant les 30 premières minutes après l'ajout de la MMC à 10 µg/ml, un premier saut de synthèse de l'ARN total. Cependant lors d'une exposition plus longue, on constate une diminution du taux de synthèse et une dégradation de l'ARN. L'hypothèse alors formulée était que la MMC pouvait affecter la fonction de l'ADN comme matrice pour la synthèse de l'ARN. On sait que la nature des adduits affectent également les complexes ADN-ARN, ADN-Protéine, ARN-protéine (Smith-Kielland 1966).

La MMC produit des liaisons covalentes ou « Inter strand Cross Link » ICL qui sont thermiquement très stables, c'est ainsi que les pontages inter-brins ont été mis en évidence par des études comparatives sur la dénaturation d'ADN non traité et traité à la MMC, après différents traitements thermiques. Cependant plusieurs cycles à des températures élevées finissent par éliminer les ICL. Les ARNm sont également touchés chez *E. coli* après quelques minutes (Smith-Kielland 1966).

3.4.2 Résistance endogène aux mitomycines chez *Streptomyces*.

Plusieurs groupes de gènes se sont révélés être importants pour la résistance endogène aux mitomycines chez *Streptomyces*.

Les gènes *mcrA* et *mcrB*, sont nécessaires à la résistance de l'hôte producteur. McrA est similaire aux oxydoréductases à oxygène. Une oxydoréductase peut servir à désactiver les ROS. C'est une enzyme qui catalyse le transfert d'électrons d'une molécule : d'un côté, il y a le réducteur, également appelé donneur d'électrons, de l'autre il y a l'oxydant, également appelé accepteur d'électrons. Ce groupe d'enzymes utilise généralement le NADP⁺ ou le NAD⁺ comme cofacteurs. McrA comprend le site connu de liaison à la flavine adénine dinucléotide (FAD) (Bass et al. 2013). La FAD est un cofacteur d'oxydoréduction dérivant de la vitamine B2. McrA est associée à une molécule de FAD liée de manière covalente qui catalyserait l'oxydation de la MMC réduite *in vivo*. De plus, le locus *mcr* est induit spécifiquement par les mitomycines et leurs métabolites ; les inducteurs les plus forts ont un NH-aziridine (par opposition à N-CH₃). L'aziridine est un composé organique utilisé dans l'industrie pétrochimique. Elle est constituée de l'hétérocycle à trois chaînons (CH₂)₂NH. C'est un liquide incolore, toxique et volatil possédant la capacité de générer des liens covalents. Les quantités de McrA augmentent de façon concomitante avec l'augmentation de la MMC endogène, ce qui suggère que l'induction de *mcr* se produit dans l'organisme producteur en réponse à l'augmentation des niveaux de MMC. L'expression de McrA dans des cellules de mammifères (ovaire de hamster chinois) permet de réduire considérablement la toxicité des mitomycines dans des conditions aérobies, mais a peu d'effet sur la toxicité en hypoxie.

La peroxydase du raifort (HRP), la myéloperoxydase (MP) et la lactoperoxydase (LP) oxydent également l'hydroquinone de la MMC en présence d'une source de peroxyde d'hydrogène ce qui empêche partiellement la production de liens covalents à l'ADN T7.

La protection cellulaire offerte par Mct vient de sa fonction de transporteur depuis le cytoplasme. La co-expression de *mrd* et *mct* chez *E. coli* entraîne une résistance considérablement accrue (150 fois) à la MMC exogène ainsi qu'une accumulation intracellulaire réduite de celle-ci.

MrD est une réductase qui catalyse le transfert direct d'hydrure du NADH à la fraction quinone de la MMC, indépendamment des conditions aérobies ou anaérobies. Ensemble, MrD et McT agissent comme un système de transport qui séquestre la pro-drogue intacte pour une excrétion efficace dans l'environnement.

Chez *Streptomyces lavendulae* (*S. lavendulae*), MRD sert de protéine de liaison à la MMC pour réduire la toxicité. Le mécanisme d'action proposé comprend la liaison au médicament, qui empêche son activation, et l'interaction avec d'autres protéines pour l'exporter hors de la cellule. Chez *C. crescentus*, un mécanisme de protection contre la MMC a été découvert. MmcA, également membre de la superfamille des dioxygénases/glyoxalases, pourrait agir de la même façon. Cette famille de protéines permet également une meilleure résistance à d'autres antibiotiques chimiquement non apparentés, comme la bléomycine (Lopes-Kulishev et al. 2015).

3.5 Conclusion agents génotoxiques.

Il existe une variété de stress qui vont générer de nombreux types de dommages à l'ADN, et vont être pris en charge par plusieurs voies de réparation. Ces éléments sont regroupés **Figure 19**.

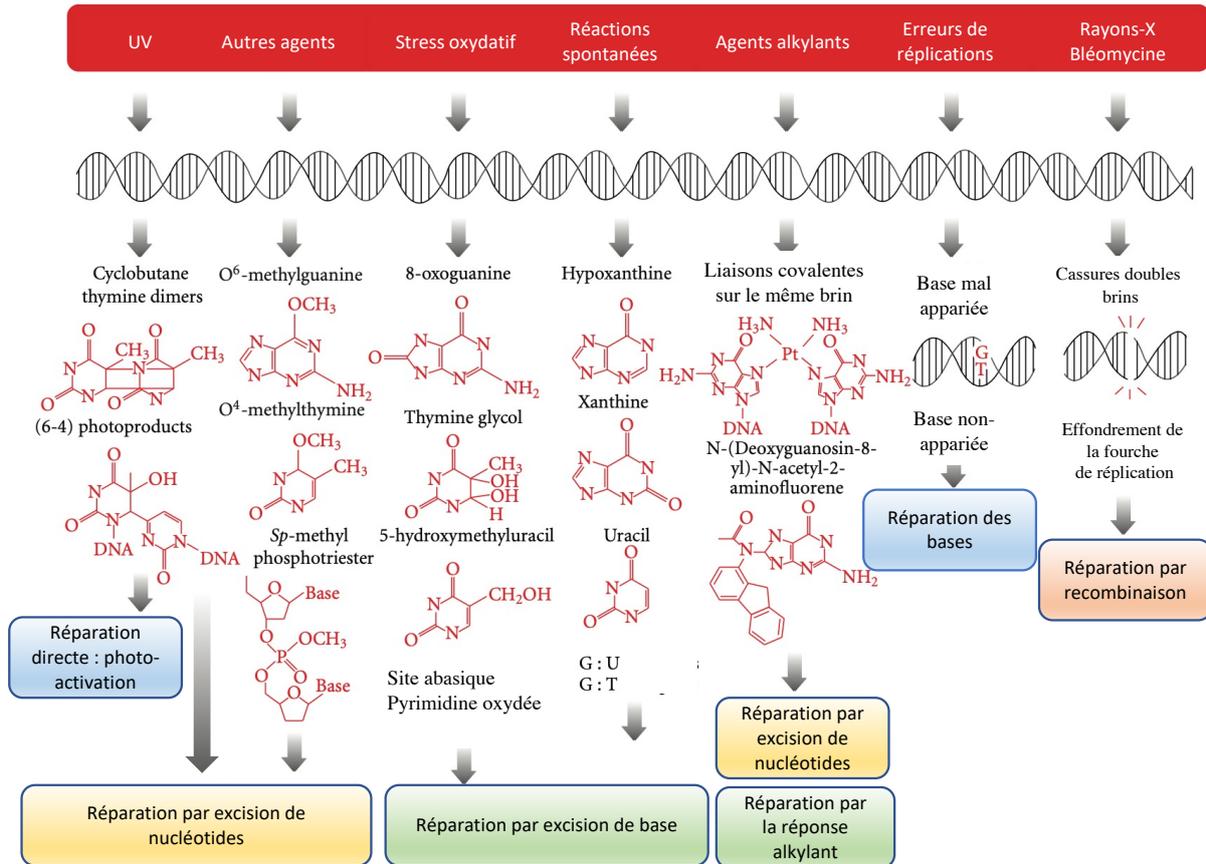


Figure 19 Variétés des voies de réparation prenant en charge diverses lésions.

Dans l'encadré rouge sont présentées les sources de dommages. En dessous de la représentation de l'ADN, une description est donnée : du type de lésions, de la modification de la structure chimique, ainsi que les voies de réparations impliquées chez *E. coli*.

Or il faut considérer la cellule dans sa globalité. Il peut y avoir des adaptations diverses impliquant la gestion du stress oxydatif. Ces agents agissent sur toute la cellule, les lipides avec la peroxydation des phospholipides, les protéines, les ARNm. C'est un cataclysme global qui s'opère. Par exemple les membranes cellulaires sont l'une des structures biologiques les plus sensibles aux dommages causés par les radicaux en raison de la présence de chaîne polyinsaturés. Une autre conséquence peut être la génération de formaldéhyde (CH₂O) qui se forme par oxydation à partir de la déméthylation de certains composants cellulaires tels que la spermine et les lipides. C'est un composant naturellement produit lors du métabolisme intermédiaire très réactif.

Autre exemple avec l'alkylation de l'ADN, l'ADN est souvent associé à des protéines, ce qui peut modifier la cible et produire des liens covalents entre ADN et protéines. De plus, quand

la réplication se maintient, cela peut générer par conséquence des contraintes topologiques, et également favoriser la toxicité génotoxiques au passage de la fourche de réplication sur l'ADNsb en les convertissant en cassures doubles brins.

3.6 Les sources de cassures doubles brins (CDB)

Une CDB est définie par une cassure de part et d'autre du duplexe d'ADN. La conséquence d'une DSB non réparée peut être le réarrangement chromosomique (translocation, inversion, délétion de certaines portions), la mort cellulaire, ou encore l'aneuploïdie pour les cellules eucaryotes.

Les CDB sont produits soit directement, ou indirectement, par une variété d'agents endogènes ou exogènes. Il y a les radiations ionisantes, les radicaux d'oxygènes, les agents chimiques (par ex : les agents alkylant).

Les rayons X et gamma sont dit ionisants car leur énergie peut transformer les atomes en ions rendant la molécule instable. Pour revenir a un état de stabilité l'atome va émettre un type de rayonnement

- Rayonnement alpha : perte de protons et des neutrons
- Rayonnement beta moins ou beta plus : transformation d'un neutron en proton ou d'un proton en neutron.
- Rayonnements X et gamma : émission d'un photon

Les CDB peuvent également survenir à la suite de clivage à l'ADN inappropriés, par des enzymes de restriction de l'hôte, particulièrement si les mécanismes d'atténuation des restrictions qui constituent la première ligne de défense de l'ADN de l'hôte sont inactivés tel que ClpXP qui cible également des nucléases (Makovets et al. 2004). De plus, dans les conditions normales de croissance, même en absence de sources de dommages, les CDB sont produits dans toutes les cellules en cours de croissances du fait de leur réplication, à la suite de l'ADN matrice imparfait.

Comment la cellule bactérienne arrive à outrepasser tous ces dommages va être présenter dans les chapitres suivants.

4 Les systèmes de réparation de l'ADN

Le maintien de l'intégrité et de la stabilité du génome est crucial pour la viabilité de l'individu et le transfert optimum de l'information génétique entre génération. Pourtant, l'ADN est une molécule altérable. Elle est soumise à des contraintes mécaniques et à de nombreux types de modifications chimiques qui peuvent entraîner des ruptures de la double hélice. Il existe un ensemble de systèmes qui interviennent dans la maintenance et la réparation de l'ADN. Chaque système est spécialisé dans une tâche généralement décrite comme spécifique d'un type de lésion. Bien qu'il existe des systèmes constitutifs tel que l'autocorrection des erreurs de l'ADN polymérase répliquative, chez *E. coli* se sont principalement des systèmes induits qui vont être les gardiens de l'information génétique. Lors de l'apparition d'une lésion différents complexes protéiques vont entrer en action dans le but de réparer et corriger la molécule d'ADN à l'identique de la séquence d'origine. Cependant ces processus peuvent introduire des altérations dans la séquence d'ADN et provoquer des mutations, délétions ou duplications. Ainsi les génomes des bactéries sont en équilibre entre maintenance et évolution.

4.1 La photoréactivation

En 1949, Kelner a fait la démonstration du phénomène de photoréactivation, à la suite d'un stimulus aux UV, les cellules *Streptomyces griseus* avaient un taux de survie jusqu'à 60 000 fois supérieur aux cellules non exposées préalablement aux UV (Kelner 1949). En 1958, Rupert a confirmé par un système « *in vitro* », qui consistait à récupérer des extraits protéiques fonctionnels d'*E. coli* activé aux UV, que cet extrait protéique pouvait photocatalyser la restauration de l'ADN d'*Haemophilus influenzae* (Rupert, Goodgal, and Herriott 1958). La réparation de ces lésions était partiellement prise en charge par le gène *phr* codant pour une photolyase (Sancar, Smith, and Sancar 1983).

La photoréactivation est le processus qui permet d'activer PHR, par irradiation première aux ultraviolets (UV) de faible énergie (350-500 nm), et de réparer les lésions aux UV à la suite du « réveil » de la protéine.

A la différence des autres voies de réparation, le gène *phr* n'est pas induit par le système SOS, système que je détaillerai dans le chapitre suivant.

Les ultraviolets font partie du spectre lumineux non visible par l'œil humain. Ce sont des ondes électromagnétiques mesurées selon leurs fréquences. Ils ont été segmentés en différentes strates de longueurs d'ondes, permettant de déterminer le degré d'intensité et d'y allouer des propriétés :

- UV-A : 400-320 nm ; (pénètrent la couche intermédiaire de la peau : le derme).
- UV-B : 320-290 nm ; (atteignent la couche externe de la peau : l'épiderme).
- UV-C : 280-100 nm ; (ils sont stoppés par la couche d'ozone, mais sont les plus toxiques s'ils nous parviennent (Svobodova, Walterova, and Vostalova 2006).

Chez les humains, ils peuvent avoir des effets bénéfiques pour la santé tels que la production de vitamine-D3 par la peau (Holick 1987), ou limiter l'évolution de la myopie avant l'âge de 20 ans (Torii et al. 2017). Cependant, ils sont surtout connus pour leurs effets délétères. A l'échelle de l'organisme, ils induisent un photo-vieillessement prématuré de la peau (rides profondes, hyper-pigmentation localisées, télangiectasies)(Gonzaga 2009) et peuvent également causer des effets mutagènes et cancérigènes.

Les bactéries sont des organismes unicellulaires, elles sont directement exposées à leur environnement dans leur entièreté. A l'échelle moléculaire, les UV modifient la structure de l'ADN. Les lésions qu'ils causent à l'ADN, incluent les liaisons transversales de celle-ci, telles que les photoproduits dont les dimères de cyclobutane-pyrimidine. Les bases puriques et pyrimidiques absorbent les radiations à 250-270 nm et vont produire un « photoproduit». Deux bases adjacentes vont fusionnées entre elles, formant une liaison covalente, voir **Figure 20**.

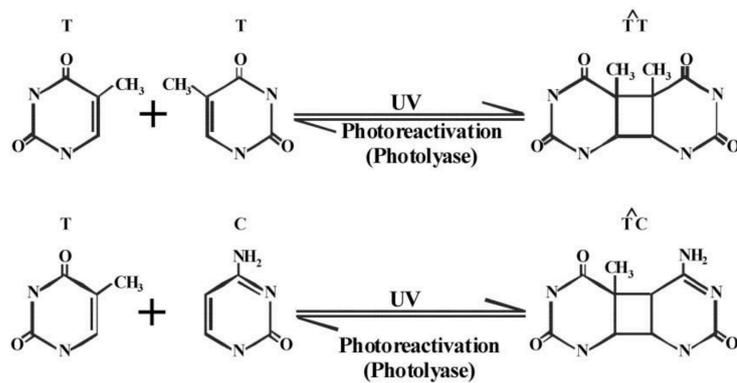


Figure 20 Lésion à l'ADN produit par les UV

Les dimères peuvent se former entre deux pyrimidines adjacentes, sur le même brin d'ADN. On voit ici dans la partie haute de la figure, le dimère de cyclobutane-pyrimidine thymine-thymine et dans la partie basse de la figure : le dimère de thymine-cytosine et leur photoréactivation par l'enzyme photolyase en présence de lumière. Figure empreinté à (Sinha and Hader 2002).

En plus des lésions de fusion de base à l'ADN, les UVA peuvent produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles-que des radicaux superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et des radicaux hydroxyle (NOH), entraînant des dommages oxydatifs aux lipides, aux protéines et à l'ADN (Santos et al. 2013). Ces ROS vont être pris en charge par d'autres systèmes de réparation.

4.2 La réparation des mésappariements (MMR)

La réparation des bases mésappariées vient seconder l'activité de correction de l'ADN polymérase répliquative, ou éliminer une partie des erreurs générées par les ADN polymérase trans-lésionnelles.

Dans un premier temps, MutS, est la protéine qui scanne l'ADN nouvellement répliqué dans le but de trouver les bases mésappariées.

Dans un deuxième temps, MutH clive le brin nouvellement répliqué car non méthylé sur les GATC, l'ADN est alors dégradé par une exonucléase. Dans ce contexte MutL peut favoriser la formation d'un complexe stable entre plusieurs protéines, favorisant ainsi le processus. MutS et MutL forment des pinces coulissantes sur un ADN mal apparié qui favorise l'action de MutH à réaliser des cassures d'ADNsb sur les sites GATC nouvellement répliqués. MutL capturent également l'hélicase UvrD (Liu et al. 2019).

Finalement une ADN polymérase synthétise la portion complémentaire manquante et une ligase vient refermer le système, voir .

Figure 21.

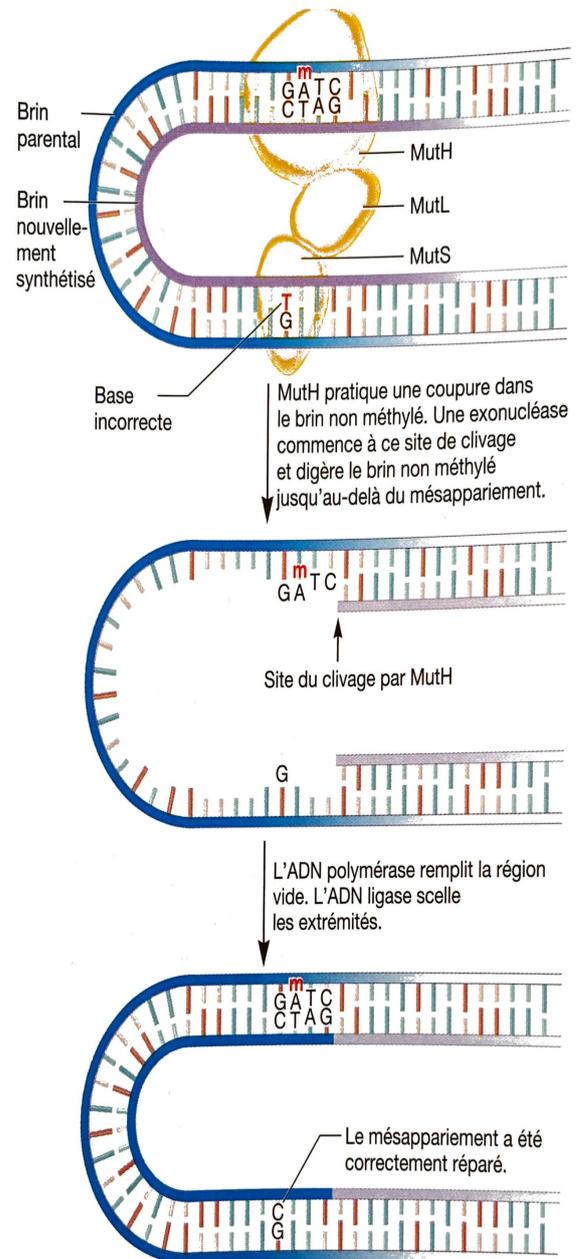


Figure 21 Réparation de mésappariement

Les mésappariements sont généralement reconnus par MutS, le brin nouvellement synthétisé est incisé par MutH. La base mésappariée est ensuite éliminée par l'action combinée d'une ADN hélicase, d'une exonucléase et d'une protéine de liaison à l'ADN simple brin. MutH identifie le brin méthylé de l'ADN. MutL stabilise MutH et MutS sur l'ADN. L'adénine méthylée est indiquée par un « m ». MutH pratique la coupure sur le brin nouvellement répliqué. Puis l'ADN polymérase synthétise la portion à partir du brin matrice permettant la correction du mésappariement.

4.3 Induction des systèmes de réparation des alkylations de l'ADN

Des agents alkylant, tel que l'acide nitreux, se retrouvent dans l'environnement, mais ils peuvent également être produit par le métabolisme de la cellule tel que le S-adenosylmethionine (SAM).

La réponse adaptative aux dommages causés par l'alkylation de l'ADN a débuté par la description de souches d'*E. coli* plus sensibles aux agents alkylant tels que le *N*-méthyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) ou la MMC, mais qui conservait une viabilité équivalente face aux UV ou aux rayons gamma. Les locus génétiques ont alors été nommés *alk* (Yamamoto et al. 1978). Les gènes de la réponse aux agents alkylants sont listés ainsi que leur fonction dans le **Tableau 1** et leurs substrats indiquées **Figure 22**.

Les produits de l'alkylations sont divers, ils peuvent mener : N^7 -methylguanine (7meG), N^3 -methyladenine (3meA), O^6 -methylguanine (O^6 meG), N^1 -methyladenine (1meA), N^3 -methylcytosine (3meC), O^4 -methylthymine (O^4 meT), et methyl phosphotriesters (MPT). (Mielecki and Grzesiuk 2014).

Tableau 1 Gènes de la réponse contre les agents alkylants

Gènes	Fonction ^a
<i>ada</i>	<i>ada</i> code une méthyltransférase bifonctionnelle et un régulateur transcriptionnel qui est un composant clé de la réponse adaptative - le mécanisme d'adaptation induit après l'exposition à de petites quantités d'agents alkylants de l'ADN.
<i>alkA</i>	AlkA est une 3-méthyl-adénine-ADN glycosylase. Le gène est induit par l'exposition aux agents alkylants dans le cadre de la réponse adaptative de la cellule aux dommages causés par l'alkylation. L'enzyme purifiée agit préférentiellement sur l'ADNdb pour éliminer la 3-méthyl-adénine et la 3-méthyl-guanine avec la même efficacité et élimine aussi, un peu moins efficacement, la 7-méthyl-adénine, la 7-méthyl-guanine, la 2-méthyl-thymine et leurs dérivés éthylés. AlkA peut également éliminer des résidus d'adénine désaminés.
<i>alkB</i>	AlkB est une dioxygénase dépendante du 2-oxoglutarate, contenant du Fe(II), qui catalyse la réparation non mutagène des lésions méthyliques de l'ADN et de l'ARN. L'enzyme est capable de réparer les lésions de méthylation sur divers substrats d'acides nucléiques (ADNsb, ADNdb, ARN, et hybrides) <i>in vitro</i> mais montre une préférence pour le substrat monocaténaire. Avec l'ADN, elle répare précisément les lésions de 1-méthyladénine et de 3-méthylcytosine. Avec l'ARN, elle répare précisément la 1-méthyladénine et la 3-méthylcytosine. AlkB peut interagir directement avec RecA <i>in vivo</i> .
<i>aidB</i>	AidB est une protéine multifonctionnelle qui fait partie de la réponse adaptative d' <i>E. coli</i> aux agents alkylants. Le rôle biologique de AidB n'est pas clair. AidB a certaines similarités avec les acyl coenzyme A déshydrogénases des mammifères. Néanmoins, AidB a une haute affinité pour le flavin adénine dinucleotide (FAD), ce qui aide à l'assemblage du tétramère AidB. Elle implique une interaction avec le facteur sigma de l'ARN polymérase Eσ70 ou EσS en inhibant leur fonctionnement.

a. Fonction obtenue pour les gènes d'*E. coli* K-12 auprès de BioCyc (<http://biocyc.org/>).

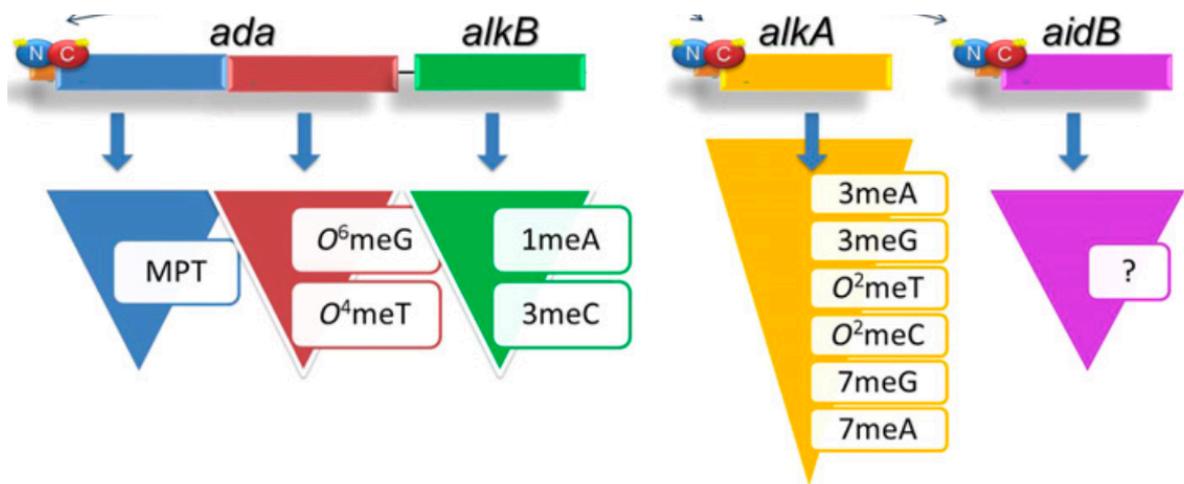


Figure 22 La réponse Ada aux agents alkylants.

La protéine Ada est méthylée au niveau de ses résidus C38 et C321 à partir d'un ADN endommagé ou par action directe d'agents alkylants. Ada méthylée (indiquée par des étoiles jaunes) est un activateur transcriptionnel de trois opérons : *ada-alkB*, *alkA* et *aidB*. Protéines synthétisées : Ada, AlkB, AlkA, et AidB agissent sur les lésions de l'ADN présentées dans les encadrées. La protéine AidB est multifonctionnelle, et un substrat spécifique de n'a pas été identifié. Figure empruntée à (Mielecki and Grzesiuk 2014).

De nouvelles expériences ont été menées avec du MNNG qui ajoute des groupes alkyles à l'O⁶ de la guanine et à l'O⁴ de la thymine, ce qui peut entraîner des mutations de transition entre GC et AT. Il a alors été démontré que les cellules étaient moins sujettes aux mutations et plus résistantes lorsqu'elles étaient pré-exposées à des doses non létales de MNNG avant d'être exposées à des doses plus élevées. La réponse *alk* est donc bien inducible. Après l'exposition à une dose sub-létale, une induction très élevée (environ 1000 fois) de l'activité méthyltransférase de Ada a été observée. Cette activité réduit de manière significative la mutagenèse et la toxicité de cet agent. De manière concomitante la N³-méthyladénine ADN glycosylase II (codée par le gène *alkA*) et les gènes *alkB* et *aidB* sont induits (Kleibl 2002). De manière intéressante ces activités viennent en complément du processus de réparation appelé Base excision repair (BER) décrit plus loin dans ce manuscrit voir **Figure 23**.

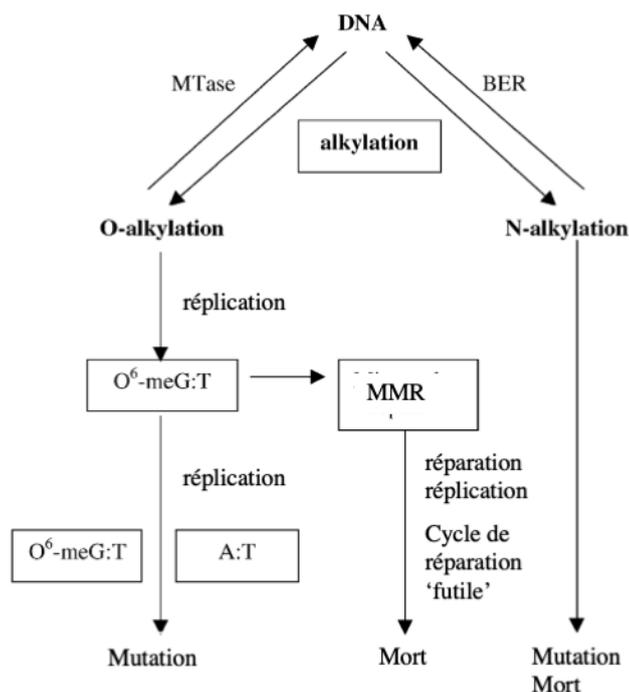


Figure 23 Prise en charge des O-alkylation et N-alkylation et leurs conséquences.

Si l' O^6 -meG n'est pas réparé de manière pré-répllicative par la MTase, il est responsable des mutations de transition GC-AT après deux cycles de réplification. L' O^6 -meG génère un effet cytostatique via l'implication du système MMR, ce qui entraîne la régénération permanente du substrat MMR par une boucle de réparation " futile ". Figure empruntée à (Kleibl 2002).

4.4 Induction par les stress oxydatifs chez *E. coli*

Chez les bactéries qui se développent dans des environnements aérobies les ROS peuvent se former de manière endogène par réaction entre l' O_2 et des donneurs d'électrons univalents, tels que les centres métalliques, les cofacteurs de la dihydroflavine (cofacteurs FADH) et les quinones. Les ROS, les espèces azotées réactives (RNS) et les espèces chlorées réactives (RCS) apparaissent notamment dans des environnements hostiles aux bactéries, par exemple dans les cellules phagocytaires telles que les macrophages et les neutrophiles (Ezraty et al. 2017). L'exposition aux ROS, RNS et RCS endommage les composants cellulaires, notamment l'ADN, les lipides membranaires et les protéines. Par conséquent, la plupart des organismes produisent des catalases, des peroxyredoxines et des superoxyde dismutases, qui sont des enzymes qui réagissent avec les oxydants nocifs et les convertissent en produits inoffensifs en les neutralisant avant qu'ils n'affectent les composants cellulaires.

Le glutathion fait parti de cet arsenal de défense, c'est une espèce chimique produite par la cellule, maintenant le potentiel redox du cytoplasme et aide à lutter contre les ROS. Le glutathion permet de réduire les liaisons disulfures en agissant comme donneur d'électrons. Une fois oxydé, le glutathion peut être réduit par la glutathion-réductase, en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons (Ezraty et al. 2017).

OxyR, dont le régulon de près de 40 gènes (**Tableau 2**), permet la détoxification des ROS chez *E. coli*. OxyR, est une protéine de 34 kDa de type capteur redox, à base de thiol. Il forme un homo-tétramère, qui se lie aux promoteurs sous ses formes oxydées et active la transcription (Hillion and Antelmann 2015) (Chiang and Schellhorn 2012).

Tableau 2 Opéron régulé par OxyR chez *E. coli*

Operon	Fonction ^a	Rpos régulon
Régulation Positive		
<i>ahpCF</i>	Alkyl hydroperoxide reductase	X
<i>dps</i>	Protéines d'attachement au Fer et de stockage	X
<i>dsbG</i>	Oxidase périplasmique disulfide isomerase/thiol-disulphide	X
<i>fpg</i>	Formamidopyrimidine	
<i>fur</i>	Régulateur transcriptionnel. Empêche l'absorption du fer	
<i>gorA</i>	Glutathione oxidoréductase	X
<i>grxA</i>	Glutaredoxin 1	
<i>hcp</i>	Clustur-hybride [4Fe-2S-2O] réductase terminale en anaérobie	
<i>hemH</i>	Ferrochélatase	X
<i>katG</i>	Catalase/hydroperoxidase I	X
<i>oxyS</i>	ARNs régulateur	
<i>mntH</i>	Transporteur de cation divalent / manganèse	
<i>rscC</i>	Kinase senseur hybride à deux composants, régulateur du système avec RcsB et YojN	
<i>sufABCDSE</i>	Fe-S assemblé protéine. SufBCD complexe, selenocysteine lyase, protéine accepteuse de sulfure	X
<i>trxB</i>	Thioredoxin réductase	
<i>trxC</i>	Thioredoxin 2	

<i>yaaA</i>	Protéine conservée	
<i>yaiA</i>	Protéine prédite	X
<i>ybjM</i>	Protéine prédite, présente dans la membrane	
<i>yhjA</i>	Prédit être cytochrome c peroxidase	
<i>yljA</i>	Protéine régulatrice pour la spécificité de substrat de ClpA.	
Régulateur négatif par OxyR		
<i>flu (agn43)</i>	Peptidase pouvant intervenir dans la formation de biofilm	
<i>fhuF</i>	Réductase ferrique, impliquée dans le transport ferrique hydroximate transport	
<i>gntP</i>	Transporteur membranaire de D-fructuronate/D-gluconate Ce gène est également réprimé par UxuR	
<i>oxyR</i>	Régulateur transcriptionnel	
<i>stiA</i>	Fimbriae sous unité	
<i>yaeaH</i>	Inconnue	
<i>ydch</i>	Inconnue	
<i>ydeN</i>	Inconnue	
<i>ytfk</i>	Inconnue	
<i>uxuAB</i>	Mannonate hydrolase	

a. Fonction obtenue pour les gènes d'*E. coli* K-12 auprès de GenProtEC (<http://genprotec.mbl.edu/>), auprès de BioCyc (<http://biocyc.org/>).

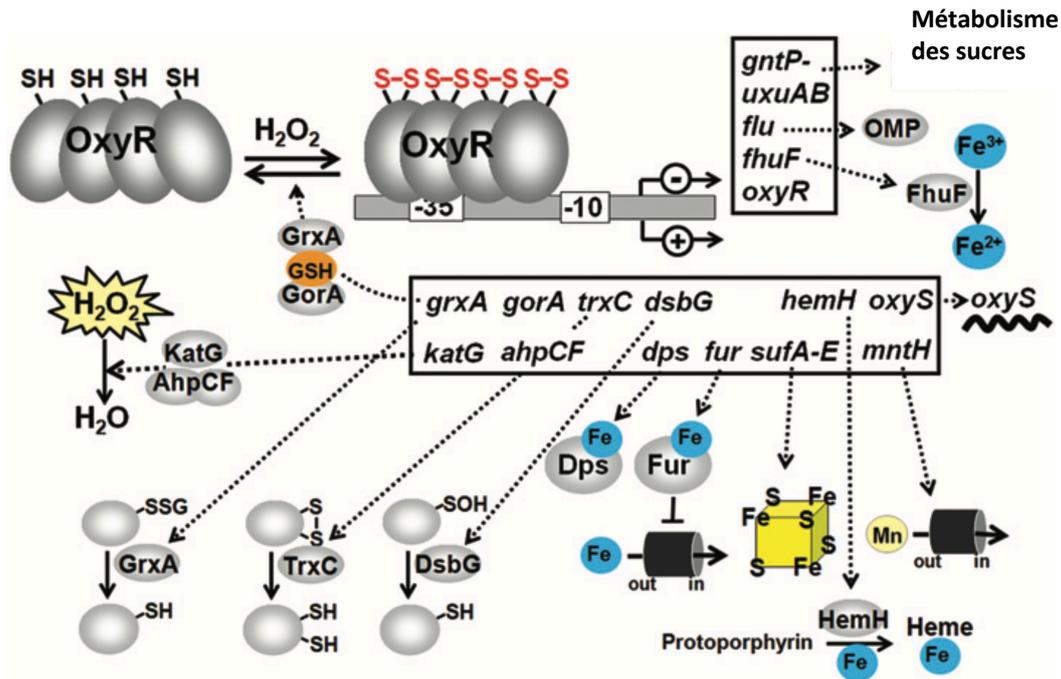


Figure 24 Modèle du mécanisme de régulation du métabolisme par OxyR

La voie de régulation induite par OxyR en réponse au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) chez *E. coli*. Les résidus conservés C199 et C208 d'OxyR sont essentiels. La C199 est initialement oxydée en un intermédiaire acide sulfénique qui réagit rapidement pour former un disulfure intramoléculaire avec la C208. OxyR oxydé se lie sous forme de tétramère aux régions promotrices des gènes cibles et active la transcription des gènes de détoxification du peroxyde par interaction avec l'ARN polymérase. OxyR contrôle positivement les gènes de détoxification du peroxyde, telle la catalase et la peroxiredoxine (*katG*, *ahpCF*), la miniférritine de stockage du Fer (*dps*), la glutaredoxine, la thiorédoxine et la glutathion réductase (*grxA*, *trxC*, *gor*), l'acide sulfénique oxydoréductase (*dsbG*), le régulateur de l'absorption du fer (*fur*), le mécanisme d'assemblage de l'amas Fe-S (*sufABCDE*), la ferrochélatase (*hemH*), l'importation du manganèse (*mntH*) et le petit ARN (*oxyS*). OxyR régule négativement sa propre expression et celle des gènes de l'ion ferrique réductase (*fhuF*), de la protéine de la membrane externe (*flu*), de la mannonate hydrolase (*uxuAB*) et de la perméase du gluconate (*gntP*). OxyR est régénéré par le système glutaredoxin/GSH/Gor lors du retour à des conditions non stressantes. Figure empruntée à (Hillion and Antelmann 2015).

4.5 La réponse SOS

Les cellules bactériennes sont capables de déceler quand leur ADN est endommagé, et par conséquent, de stopper leurs divisions cellulaires, pour réparer les lésions du chromosome. En 1974, Miroslav Radman a été l'un des premiers à décrire l'existence d'une voie de signalisation induite à la suite de dommages à l'ADN chez *E. coli* : la réponse SOS (Radman 1975). M. Radman l'a défini comme un signal de détresse utilisé pour détecter les dommages à l'ADN ou les blocages de la fourche de réplication.

La réponse SOS est un point de contrôle, verrouillé par la protéine LexA, permettant de libérer les acteurs servant à réparer l'ADN et de prévenir la naissance de cellules filles comportant un génome endommagé, potentiellement non viable. Lorsque l'ADN est endommagé, le répresseur transcriptionnel LexA est détruit ; les gènes de la réponse SOS sont activement transcrits (plus de 40 gènes induits, référencés **Tableau 3**) (Brent and Ptashne 1981; Fernandez De Henestrosa et al. 2000; Courcelle et al. 2001). Certains de ces gènes servent à réparer l'ADN, d'autres à réguler le cycle cellulaire de la bactérie, et à bloquer la division cellulaire, ce qui a pour conséquence la formation de cellules bactériennes géantes formant des filaments. Une fois l'ADN réparé, la quantité d'ADN simple brin baisse, l'activité de RecA disparaît, et les protéines LexA peuvent de nouveau s'accumuler et réprimer la réponse SOS (Little and Mount 1982).

Tableau 3 Gènes induits lors de la réponse SOS

Operon SOS	Fonction ^a	ClpXP ^b
Régulation Positive		
<i>cho</i> (<i>ydjQ</i>)	Cho est une endonucléase dépendante d'UvrAB qui peut contribuer au NER lorsque les lésions de l'ADN sont mal incisées par UvrC.	
<i>ddlB</i>	Ligase	
<i>dinB</i>	ADN polymérase IV dépourvue d'activité de relecture.	
<i>dinD</i>	Intervient dans la sensibilité au froid. La mutation conduit également à l'induction de la réponse SOS à basse température, même sans lésion à l'ADN.	
<i>dinF</i>	Intervient dans la protection contre les ROS, probablement via l'exportation des espèces oxydantes.	
<i>dinG</i>	DinG est une hélicase. Peut intervenir sur les D-loops et R-loops, ainsi que les duplexes ADN-ARN.	
<i>dinI</i>	Régulateur de la stabilité de RecA. À des concentrations stœchiométriques avec RecA, la protéine DinI stabilise le filament de RecA, réduisant ou empêchant son désassemblage. DinI à plus forte concentration a l'effet inverse. DinI et RecX constituent un réseau de régulation de RecA.	
<i>dinJ</i>	DinJ sert d'anti-toxine à la toxine YafQ. DinJ peut être dégradée par les protéases Lon and ClpXP.	X ^b
<i>dinQ</i>	<i>dinQ</i> code pour une petite protéine toxique (27 acides aminés) qui se localise à la membrane interne d' <i>E. coli</i> K-12.	
<i>dnaG</i>	L'ADN primase catalyse la synthèse d'amorces ARN sur une matrice d'ADN simple brin. Ces amorces servent ensuite de point de départ à la synthèse de l'ADN par l'ADN polymérase III.	
<i>ftsA</i>	FtsA est une protéine essentielle de la division.	
<i>ftsI</i>	FtsI ou "penicillin-binding protein 3", essentielle à la division cellulaire.	
<i>ftsK</i>	FtsK coordonne la division cellulaire à la ségrégation des chromosomes.	
<i>ftsL</i>	FtsL est essentielle à la division cellulaire. Forme un complexe avec FtsB et FtsQ	
<i>ftsQ</i>	FtsQ participe à la formation du septum.	
<i>ftsW</i>	peptidoglycan glycosyltransferase	
<i>ftsZ</i>	Essentiel à la division cellulaire.	X ^b
<i>murC</i>	UDP-N-acetylmuramate-alanine ligase.	
<i>murD</i>	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine:D-glutamate ligase	
<i>murE</i>	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate 2,6-diaminopimelate ligase (MurE)	
<i>murF</i>	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2,6-diaminopimelate-D-alanyl-D-alanine ligase	
<i>murG</i>	<i>murG</i> est une N-acetylglucosaminyl transférase responsable pour la formation du peptidoglycan intracellulaire.	

<i>mraY</i>	La phospho-N-acétylmuramoyl-pentapeptide transférase catalyse la première étape des réactions du cycle des lipides dans la voie de biosynthèse des peptidoglycanes de la paroi cellulaire.	
<i>polB</i>	ADN polymérase II (également <i>dinA</i>), est une polymérase et exonucléases impliquée dans la reprise de la réplication après lésions aux UV, synthèse trans-lésionnelle, et NER.	
<i>ptrA</i>	Protéase III est une métallo-endopeptidase à zinc. La protéase III est une protéine périplasmique qui dégrade rapidement les petites protéines et les peptides <i>in vitro</i> .	
<i>recA</i>	RecA est une recombinaise. Elle joue un rôle central dans le processus de recombinaison homologue. Participe à l'induction de la réponse SOS.	
<i>recB</i>	RecB est l'une des trois protéines du complexe hélicase/nucléase hétérotrimérique connu sous le nom d'Exonucléase V ou RecBCD qui favorise la recombinaison homologue dans la réparation des cassures de l'ADN double brin ou encore pendant la conjugaison bactérienne.	
<i>recC</i>	RecC est l'une des trois protéines du complexe hélicase/nucléase hétérotrimérique RecBCD.	
<i>recD</i>	RecD est l'une des trois protéines du complexe hélicase/nucléase hétérotrimérique RecBCD.	
<i>recF</i>	Appartient aux complexes RecFOR. Protéine médiatrice de recombinaison. RecF et RecR sont nécessaires pour réinitialiser la réplication à partir d'une fourche de réplication interrompue.	
<i>recG</i>	RecG est une ADN hélicase impliquée dans la réparation des cassures double-brin. Elle permet d'éviter des formes de réplication aberrante de l'ADN suite à des collisions de fourches de réplifications.	
<i>recJ</i>	RecJ est une exonucléase processive spécifique de l'ADNsb. Elle est impliquée dans la recombinaison et la réparation dépendante de RecF. Elle élargie les régions d'ADNsb. Recombinaison déficient avec $\Delta recB \Delta recC \Delta sbcB$	
<i>recN</i>	RecN a pour fonction de promouvoir la réparation des cassures double-brin de l'ADN par recombinaison homologue.	X ^b
<i>recO</i>	RecO est une protéine médiatrice de la recombinaison.	
<i>recQ</i>	RecQ a pour fonction de bloquer la recombinaison illégitime, de renforcer l'activité de la topoisomérase, d'initier la signalisation SOS et d'éliminer les fourches de réplication bloquées.	
<i>recX</i>	RecX est un inhibiteur de RecA. Il entre en compétition avec DinI. RecX s'associe à RecA et inhibe les activités d'hydrolyse de l'ATP, de coprotéase et d'échange de brins d'ADN de RecA.	
<i>rpsU</i>	La protéine S21 est un composant de la sous-unité 30S du ribosome. S21 est nécessaire à la pleine activité de l'initiation de la traduction.	
<i>sbcC</i>	SbcC est un inhibiteur du surenroulement de l'ADN médié par l'ADN gyrase. SbcC inhibe l'activité de l'ADN gyrase à une étape précoce. SbcC atténue les dommages causés à l'ADN par des agents alkylants.	
SSB	Les SSB protègent l'ADNsb de la dégradation en se fixant sur l'ADN. Elles permettent également de le garder déployé.	
<i>tisB</i>	TisB est le peptide toxique d'un système toxine-antitoxine de type I composé d'une protéine toxique et d'une petite antitoxine ARN. La TisB est impliquée dans la formation des persister. TisB peut agir en formant des canaux anioniques dans la membrane plasmique, conduisant à une dépolarisation de la membrane.	
<i>umuC</i>	ADN polymérase V, non fidèle impliquée dans la protection contre les UV. Appartient au système de réparation trans-lésionnel (TLS).	

<i>umuD</i>	ADN polymérase V, non fidèle. Impliqué dans la protection contre les UV. Appartient au système de réparation trans-lesionnel (TLS).	X ^b
<i>uvrA</i>	UvrA reconnaît les distorsions incorrectes de l'ADN double brin. UvrA est le premier acteur dans la voie du NER. UvrA s'associe à UvrB pour former un complexe UvrA ₂ B.	X ^b
<i>uvrB</i>	Participe à la reconnaissance des dimères de pyrimidine et permet le chargement d'UvrC sur l'ADN sur la région lésée.	
<i>uvrC</i>	Endonucléase de la voie du NER. Permet l'excision de la région lésée.	
<i>uvrD</i>	UvrD est une hélicase de l'AND de polarité 3' à 5'. Impliqué dans le NER après l'incision par UvrC.	
<i>uvrY</i>	UvrY est un régulateur de la protéine de détection BarA. Cette protéine appartient à la famille LuxR/UhpA. Ce régulateur participe au contrôle de plusieurs gènes impliqués dans le système de réparation de l'ADN et le métabolisme du carbone.	
<i>lexA</i>	Répresseur transcriptionnel de la réponse SOS.	X ^b
<i>phR</i>	ADN photolyase activée par les UV (200-300nm).	
<i>rmuC</i>	RmuC contient des domaines de nucléase. Peu d'information. Fonction prédite est de limiter la recombinaison.	
<i>ruvA</i>	RuvA a une grande affinité pour les jonctions Holliday. Avec RuvB, elle est le médiateur de la migration des branches des jonctions de Holliday.	
<i>ruvB</i>	Médiateur de la migration des branches des jonctions de Holliday.	
<i>ruvC</i>	RuvC est une endonucléase qui se lie aux jonctions de Holliday et les clive.	
<i>rpoD</i>	Sigma factor 70. Il est le principal facteur sigma de la croissance exponentielle.	
<i>sulA</i>	SulA inhibe la division cellulaire en bloquant la polymérisation de FtsZ	X ^b
<i>xseB</i>	XseB s'associe à XseA, elles forment une exonuclease VII. L'exonuclease VII dégrade l'ADNsb dans les deux directions.	
<i>ydjM</i>	Fonction inconnue.	
<i>yehF</i>	Fonction inconnue. Chez <i>E. coli</i> K-12, les cadres de lecture ouverts de <i>yehFGH</i> pourrait être un seul gène qui est interrompu par une mutation de type « frameshift ».	
<i>yebG</i>	Fonction inconnue. Le gène est important pour la survie au rayon X.	
<i>exoX</i>	L'exonucléase X est une enzyme de réparation de l'ADN impliquée dans la réparation des mésappariements. Elle est capable de dégrader aussi bien l'ADN simple brin que le duplex.	
<i>yafN</i>	YafN est l'antitoxine de la toxine interférase ARNm associée au ribosome YafO. YafN est essentiel lorsque YafO est présent.	
<i>yafO</i>	YafO est la toxine du système toxine-antitoxine YafO-YafN, agissant comme une interférase ARNm dépendante du ribosome. Lorsqu'il est associé au ribosome, YafO inhibe la synthèse des protéines en clivant les ARNm en aval du site d'initiation de la traduction	
<i>yafP</i>	Fonction inconnue.	
<i>YbaB</i>	L'expression du gène <i>ybaB</i> est régulée par la σ E, suggérant une implication dans la réponse au stress extracytoplasmique.	
<i>ybdY</i>	Fonction inconnue.	

<i>ybfE</i>	Fonction inconnue.	
<i>ybiB</i>	Fonction inconnue.	
<i>symE</i>	Appartient à la superfamille des protéines AbrB. Le rôle de SymE dans la réponse SOS peut consister à réutiliser des ressources telles que les ARN endommagés.	
<i>insK</i>	Fonction inconnue.	

a. Fonction obtenue pour les gènes d'*E. coli* K-12 auprès de EcoCyc (<https://biocyc.org>)

b. Références qui identifient les protéines ciblées par ClpXP (Neher et al. 2006)

Au-delà de l'aspect purement réparation, la réponse SOS augmente la capacité de mutation (McKenzie et al. 2000) provoque l'induction de prophages de la famille du phage λ (Little and Mount 1982) et bloque la division cellulaire. La réponse SOS est présente chez de nombreuses bactéries (Baharoglu and Mazel 2014). Plusieurs études suggèrent qu'elle peut jouer d'autres rôles, comme chez les pathogènes *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* qui l'utilisent comme mécanisme de résistance aux antibiotiques (Blazquez et al. 2006; Cirz et al. 2007). L'induction du SOS par un antibiotique, favorise à la fois l'apparition de mutations conférant la résistance mais favorise aussi le transfert des îlots de pathogénicité (Ubeda et al. 2007). Elle joue également un rôle dans l'émergence de « persisters » qui sont une sous-catégorie de bactéries tolérantes aux antibiotiques bactéricides au sein d'une population sensible. Les persisters présentent une croissance lente ou nulle, une diminution de l'activité des cibles des antibiotiques (réplication, traduction, synthèse de l'enveloppe).

Chez certaines *E. coli* la formation de cellules tolérant la ciprofloxacine implique le système SOS via l'activation système toxine-antitoxine : TisB/IstR (Dorr, Vulic, and Lewis 2010). TisB est un petit peptide membranaire qui diminue la force motrice protonique et les niveaux d'ATP, interrompant le métabolisme cellulaire et induisant la dormance (Dorr, Vulic, and Lewis 2010). Paradoxalement, l'expression élevée de la toxine TisB protège les cellules persister contre la ciprofloxacine mais augmente la sensibilité à la mitomycine-C (Edelmann et al. 2021).

4.5.1 RecA : inducteur de la réponse SOS et élément central de la recombinaison homologue.

La protéine RecA, est l'acteur central dans la réparation de l'ADN. Elle est nécessaire pour l'induction de la réponse SOS, la recombinaison homologue, et pour la synthèse trans-lésionnelle. Dans cette partie, je vais développer son rôle dans l'induction de la réponse SOS, et revenir sur ses autres aspects, respectivement dans les chapitres concernant la recombinaison homologue (4.8) et la synthèse trans-lésionnelle (4.10).

RecA est l'inducteur de la réponse SOS. Clark et Margulies ont d'abord isolé des mutants du gène *recA* d'*E. coli* sensibles aux agents génototoxiques et incapables d'effectuer de la recombinaison (Clark and Margulies 1965). La liaison de RecA à de l'ADNsb va permettre l'induction de la réponse SOS car sous forme de filament sur l'ADNsb il devient un cofacteur du clivage autocatalytique du répresseur du SOS, LexA (Little and Mount 1982). Un monomère de RecA se lie à trois nucléotides, polymérisant ainsi de manière non spécifique sur l'ADNsb ATP dépendant (et dans une moindre mesure, l'ADNdb). RecA liée à l'ADNsb forme un nucléofilament hélicoïdal, qui est la forme active de la protéine pour l'échange de brins d'ADN et le clivage de LexA (Story and Steitz 1992). Environ 10% des cellules d'*E. coli* induisent spontanément le SOS dans une culture en phase exponentielle non stressée (Massoni et al. 2012), cela suggère que les lésions de l'ADN sont très fréquentes. RecA est exprimée de manière importante en conditions normales et lui-même sur-exprimé par le SOS lorsque les lésions génotoxiques s'accumulent (Sargentini and Smith 1986).

En raison de la puissante capacité à effectuer la recombinaison, RecA doit être contrôlée pour éviter les recombinaisons anarchiques qui pourraient conduire à des réarrangements génomiques, des mutations ou à la mort de la bactérie. Les systèmes RecBCD et RecFOR qui contrôlent l'accès de RecA à l'ADN assurent le l'activation opportune de RecA.

4.5.2 LexA : le verrou de l'induction

LexA (pour « locus A de la sensibilité aux rayons X ») est un répresseur transcriptionnel. LexA est structurellement défini par deux domaines principaux : le domaine N-terminal qui est

important pour la dimérisation et le domaine C-terminal qui est important pour l'auto-clivage, ils sont joints par une charnière flexible (Little 1991). Le domaine N-terminal, comprenant les acides aminés de 1 à 84, permet la reconnaissance de la boîte SOS. Le domaine C-terminal est nécessaire à la dimérisation de LexA (Zhang, Pigli, and Rice 2010).

En absence de dommage, LexA forme un homodimère qui se lie à une séquence palindromique de 20 pb : 5'-TACTG(TA)₅CAGTA-3' dans la région promotrice de chaque gène de la réponse SOS, ce sont les boîtes SOS (Fernandez De Henestrosa et al. 2000), LexA liée à l'ADN limite l'accès du facteur sigma de l'ARN polymérase au promoteur (Little and Mount 1982).

En présence de dommage, RecA sur l'ADNsb induit l'autoprotéolyse de LexA. LexA possède une activité d'autoprotéolyse. Le clivage de LexA libère l'expression du régulon SOS (Little and Mount 1982). LexA est dégradé à 80% en 3 min après un traitement UV léger de 10 J/m² (Little and Mount 1982).

Les boîtes SOS contiennent une séquence consensus 5'-CTGT avec une certaine préférence pour les séquences alternées (AT)₄. Dans la séquence consensus 5'-CTGT, les bases centrales T et G sont absolument nécessaires pour la liaison avec LexA. Bien que ce soit une réponse pléiotropique, tous les gènes ne sont pas induits de la même façon au même moment, ils sont orchestrés selon une temporalité (Friedman et al. 2005). Il existe une légère diversité de séquences dans les boîtes SOS qui y contribue, ainsi que leur localisation sur le chromosome. Il existe un degré d'induction qui peut aller de 100 fois, avec *suIA* un des gènes les plus fortement réprimé, quand *uvrA*, *uvrB*, *uvrD*, *ruvAB* et *lexA* ne sont que de 4 à 5 fois plus exprimés (Lin and Little 1988; Maslowska, Makiela-Dzbenka, and Fijalkowska 2019).

Le clivage de LexA au niveau de la liaison Ala84-Gly85 située dans la région charnière, sépare les domaines N et C-terminaux, inactivant LexA. Les deux fragments de LexA sont des cibles pour la protéase ClpXP. ClpXP reconnaît ces fragments en utilisant des motifs de séquence qui flanquent le site d'auto-clivage mais qui sont cachés dans la protéine LexA intacte. La dégradation par ClpXP du fragment de liaison à l'ADN de LexA est importante pour la survie des cellules après un dommage à l'ADN (Neher et al. 2003). Le modèle de la réponse SOS est présenté **Figure 25**.

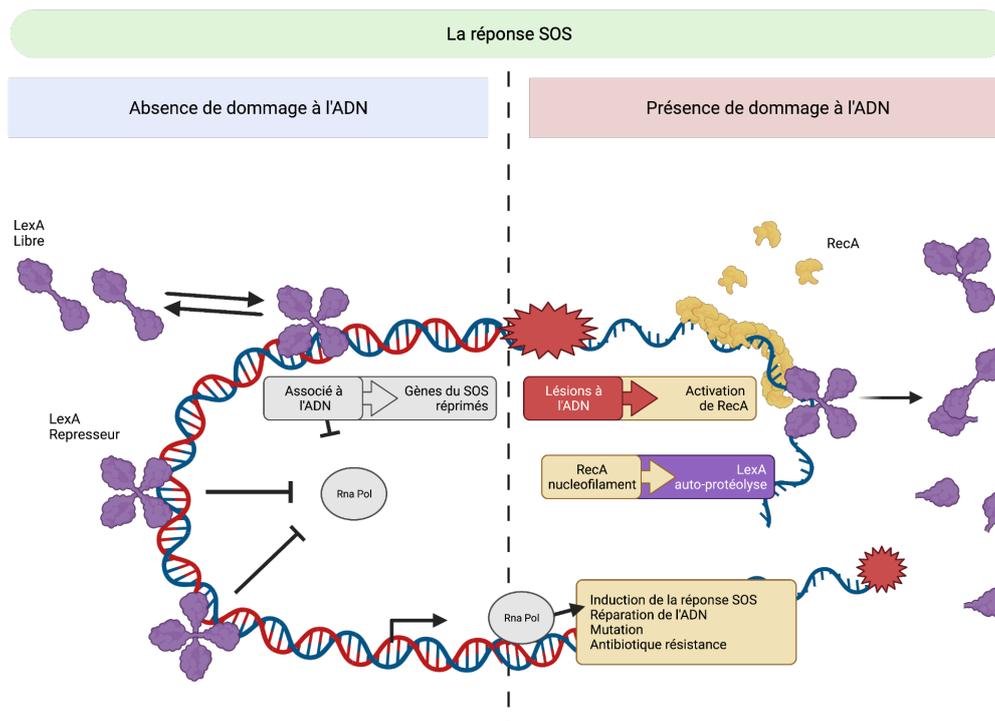


Figure 25 Modèle d'activation de la réponse SOS d'*E. coli*

L'induction de la réponse SOS est permise par la présence d'ADN simple brin. L'accumulation d'ADN simple brin est la résultante des lésions faites à l'ADN (étoile rouge). L'ADNsb est ensuite recouvert par l'oligomérisation de RecA. Le filament nucléoprotéique formé (RecA/ADNsb), stimule l'activité protéasique du répresseur transcriptionnel LexA (protéine bleue). LexA s'auto-clive, entraînant la dé-répression du régulon SOS. De nombreux gènes du régulon sont impliqués dans la réparation de l'ADN : la tolérance aux dommages de l'ADN et la régulation de la division cellulaire. Les sites de liaison de LexA sont spécifiques.

4.5.3 DnaA, un inducteur secondaire de certains gènes de la réponse SOS

Il a été découvert que non seulement LexA régulent la transcription de *uvrB* chez *E. coli*, mais également DnaA. La protéine DnaA est connue pour initier la réplication chromosomique en interagissant avec des séquences dites DnaA-boxes, autour de l'origine de réplication, l'*oriC*. DnaA est également un facteur de transcription, réprimant la transcription en se liant aux boîtes DnaA dans les régions promotrices, telles que celles trouvées dans les promoteurs du gène *dnaA* lui-même (Warr et al. 2019). La région promotrice *uvrB* d'*E. coli* contient trois promoteurs, à savoir *uvrBp1*, *uvrBp2* et *uvrBp3* (Sancar et al. 1982). La pleine activité de la région promotrice *uvrB* nécessite les promoteurs *uvrBp1-2* et *uvrBp3*. Étonnamment, le promoteur *uvrBp3* contient des boîtes DnaA (Arikan et al. 1986) qui constituent le site DARS1 (site de réactivation DnaA). Dans ce travail de 2018, il est montré

que les promoteurs *uvrB* sont réprimés à la fois par DnaA et LexA qui se lient spécifiquement à sa région promotrice de manière compétitive ou indépendante. Deux autres gènes du régulon SOS, *recN* et *dinJ*, sont également réprimés à la fois par DnaA et LexA (Fernandez De Henestrosa et al. 2000) L'absence simultanée de répression dépendante de LexA et de DnaA conduit à la production de cellules filamenteuses, des défauts de réplication de l'ADN, des nucléoïdes anormaux ainsi qu'une croissance lente. Il est probable que la régulation de l'expression des gènes par DnaA maintienne l'intégrité du génome pendant la réponse SOS chez *E. coli*. DnaA est, en effet, impliqué dans le contrôle d'autres gènes du régulon SOS (Wurihan et al. 2018).

4.5.4 Sula : point de contrôle de la reprise du cycle cellulaire.

Sula (le gène est également nommé *sfiA*) fait partie des protéines induites lors de la réponse SOS (Cole 1983). Sula inhibe la division cellulaire en bloquant l'assemblage de l'anneau FtsZ permettant la septation (Huisman, D'Ari, and Gottesman 1984). Voir représentation de la succession des étapes **Figure 26**. Bien que la septation soit stoppée, la cellule bactérienne continue à croître et filamente (Gullbrand and Nordstrom 2000). En présence de GTP, Sula se lie à la protéine FtsZ dans un rapport stœchiométrique de 1:1, inhibant ainsi la polymérisation de FtsZ et bloquant la formation de l'anneau Z (Trusca et al. 1998). Ce mécanisme empêche la séparation des copies homologues vers les cellules filles pendant la division cellulaire. La filamentation est un phénotype transitoire qui se résorbe petit à petit après l'arrêt de l'induction SOS. Après un bref traitement à la MMC (10 min), il faut environ 3 h pour que les cellules retrouvent une taille normale (Vickridge et al. 2017). La filamentation *via* induction du SOS pourrait augmenter la survie de la bactérie en condition hostile pour d'autres raisons, par exemple pour limiter la phagocytose par les cellules immunitaires ou les protistes.

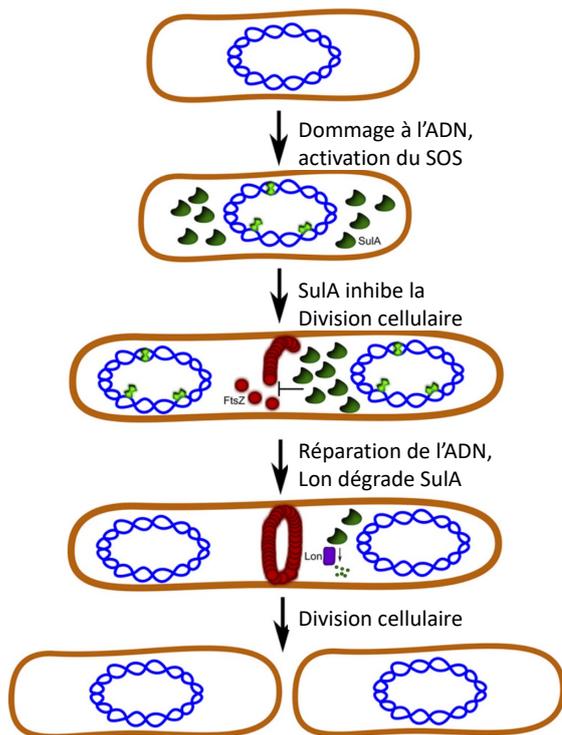


Figure 26 Implication de la réponse SOS sur la division cellulaire

Point de contrôle du cycle cellulaire dépendant des dommages à l'ADN chez *E. coli*. Lorsque les cellules d'*E. coli* subissent des dommages à l'ADN (polygones verts), la réponse SOS est activée et l'inhibiteur de division cellulaire SulA est surexprimé (vert foncé). SulA empêche la division cellulaire en inhibant l'assemblage de l'anneau FtsZ (cercles rouges). Après la réparation de l'ADN et la fin du SOS, SulA est dégradé par la protéase Lon, ce qui permet à la division cellulaire de se poursuivre. Cette figure est adaptée de la référence « *Regulation of Cell Division in Bacteria by Monitoring Genome Integrity and DNA Replication Status.* ».

Un mutant déficient en *lexA* permet donc l'induction constitutive de la réponse SOS. Mais pour que la bactérie puisse survivre, il faut que la mutation soit combinée à *sulA*, afin de stopper la filamentation induit par l'absence de division (O'Reilly and Kreuzer 2004).

4.6 Réparation par excision de base « Base Excision Repair » (BER).

Le BER protège les cellules des effets délétères des lésions endogènes qui modifient la structure des bases des acides nucléiques. Ce type de lésions est provoqué par l'hydrolyse ou l'oxydation de bases, à la suite de ROS ou d'autres métabolites intracellulaires, ainsi que les rayonnements ionisants et les agents alkylants (Kow 1994).

Les enzymes pivots impliquées dans le BER sont les ADN glycosylases. Ce processus d'élimination d'un groupe amine est réalisé par clivage de la liaison N-glycosidique entre la base et les fragments 2-désoxyribose des résidus nucléotidiques. Différentes ADN-glycosylases éliminent différents types de dommages, et la spécificité de la voie de réparation est déterminée par le type de glycosylase impliquée (Seeberg, Eide, and Bjørås 1995). Il y a 9 ADN glycosylases référencées dans EcoCyc voir **Tableau 4**.

Tableau 4 Glycosylases chez *E. coli*

Protéines	Fonction ^a
Tag	ADN glycosylase 1, 3-methyl-adenine ADN (constitutive) intervient préférentiellement sur l'ADNdb.
MutY	ADN glycosylase de l'adénine
AlkA	ADN glycosylase 2, ADN-3-méthyladenine (3-méthyl-adenine ADN glycosylase II, induite après exposition aux agents alkylants, impliquée également dans la réparation des lésions engendrées par NO ₂) (Terato et al. 2002). La réponse adaptative est distincte de la réponse SOS, la réponse adaptative n'est induite que par les dommages dus à l'alkylation et est indépendante (Lindahl et al. 1988) Les recherches sur cette voie potentielle, n'ont pas amené à des publications récentes chez les bactéries.
MutM	ADN glycosylase ADN-formamidopyrimidine (<i>8-oxoguanine DNA glycosylase</i>). L'analyse de la réparation de l'ADN à la suite de stress oxydatif avec du peroxyde dihydrogène (H ₂ O ₂) suggère que MutM est la première ADN glycosylase qui élimine les purines oxydées et d'autres pyrimidines oxydées (Schalow, Courcelle, and Courcelle 2011).
Nth	ADN glycosylase bi-fonctionnel : Endonucléase III.
del	ADN glycosylase bi-fonctionnel Endonucléase VIII.
YcaQ	ADN glycosylase alkylpurine qui agit sur les ICL formés par les agents à la purine position N ³ ou N ⁷ .
Mug	ADN glycosylase uracil en phase stationnaire lors du MMR.
UnG	ADN glycosylase uracil

a. Fonction obtenue pour les gènes d'*E. coli* K-12 auprès de EcoCyc (<https://biocyc.org>)

Elles peuvent cibler les modifications telles que la modification de base comme l'uracile, l'hydroxyméthyluracile, la méthylcytosine, l'hypoxanthine, les mis-appariements G-T, la 3-méthyladénine, la 7-méthylguanine, la 3-méthylguanine, la formamidopyrimidine, la 8-hydroxyguanine. Une fois la base enlevée, le site apurinique/aprimidinique (AP) est retiré par une endonucléase de Classe II en 5' du site AP ou une lyase de Classe I en 3' du site AP (Seeberg, Eide, and Bjørås 1995). Le résidu phosphate du désoxyribose restant est excisé par une phosphodiesterase ; l'espace résultant est rempli par une ADN polymérase I, et le brin est scellé par une ADN ligase (voir **Figure 27**).

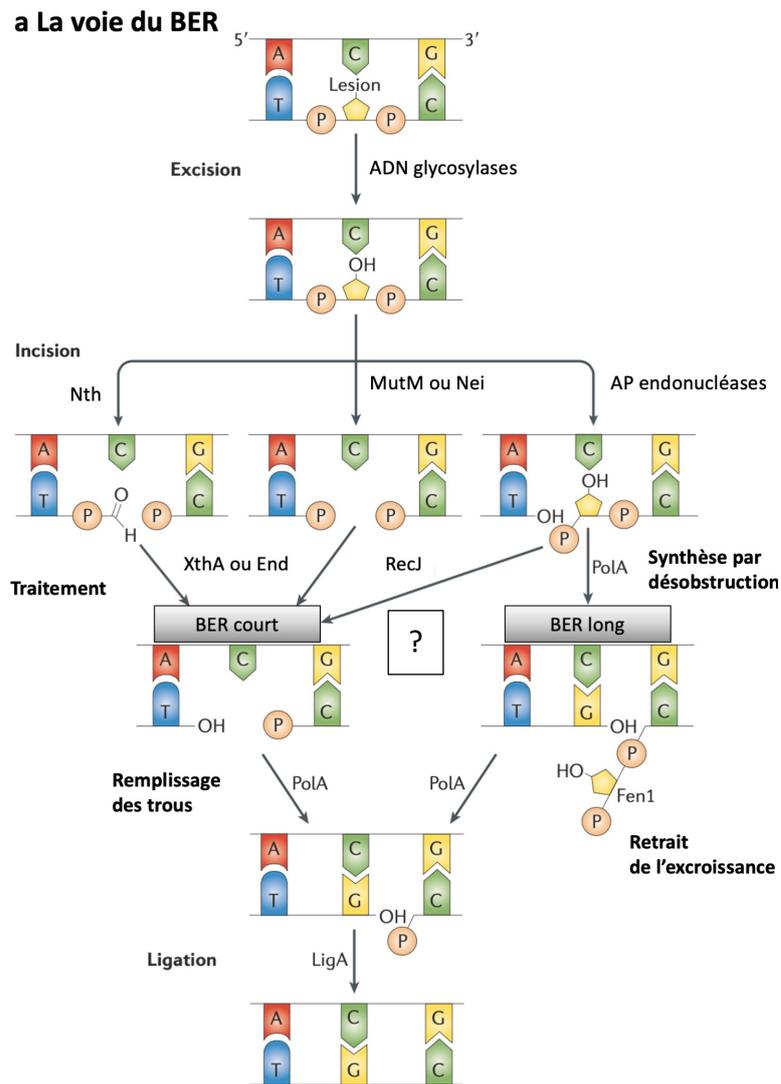


Figure 27 Représentation schématique de la voie de réparation du BER

a. La base endommagée est reconnue par l'ADN glycosylases (telle que formamidopyrimidine ADN glycosylase (MutM), Nth, Nei, MutY, Ung, AlkA, Mug, et Tag) puis éliminée. Durant l'excision, la base endommagée est enlevée. Les glycosylases bi-fonctionnelles clivent le squelette de l'ADN après l'excision de la base, cela se produit par β -élimination (par Nth) ou δ -élimination (par MutM ou Nei). Les AP endonucléases (XthA ou membre apparenté) clivent également le squelette de l'ADN. Dans le BER court : le trou généré par coupure, est traité par une endonucléase AP (XthA ou End), une ADN glycosylase δ -éliminée (MutM ou Nei), résultant un 5'-phosphate et 3'-hydroxyl groupes. La brèche est ensuite re-synthétisée par l'ADN polymérase I (PolA), et puis l'ADN est ligué par LigA. Dans le BER long, 2–10 nucléotides sont ajoutés par PolA dans un processus nommé synthèse par déplacement, et la mini-excroissance est éliminée par Fen1; puis la brèche liguée par LigA. Figure adaptée de (van der Veen and Tang 2015).

La réparation par excision de nucléotides joue un rôle de secours pour la réparation par excision des bases en éliminant les lésions telles que les thymine glycols et la 8-oxoguanine à une vitesse lente mais physiologiquement pertinente.

4.7 La réparation par excision de nucléotides NER.

Le Nucléotide excision repair (NER) est induit par la réponse SOS (Kenyon and Walker 1981). Chez *E. coli*, les protéines UvrA, UvrB, UvrC et UvrD sont les acteurs du NER (Zou, Luo, and Geacintov 2001). Le complexe UvrABC repère les modifications dans la courbure de l'ADNdb induites par certaines lésions. Deux types majeurs de lésions changent la structure topologique de l'ADN : les dimères de pyrimidine induits par les UV et les adduits entre deux bases. Les adduits constituent des liens covalents entre deux bases d'ADN. Si ils sont sur les brins opposés cela se nomme « interstranded cross link » (ICL). Ils sont générés par des agents tel que : la MMC, le sulfure, l'acide nitreux, le psoralène et la lumière.

Les mutants de la voie du NER sont sensibles aux radiations UV. La lumière UV produit deux type de lésions principales : les dimères de cyclo-butane et les 6-4 photo-produits. L'élimination des dimers de pyrimidines par le NER a été décrite pour la première fois chez *E. coli* en 1964 par les travaux pionnier de Dick Setlow (Setlow and Carrier 1964) et de manière indépendante par Dick Boyce et Paul Howard-Flanders (Boyce and Howard-Flanders 1964). Les mutants de la voie du NER sont également sensibles aux agents alkylants. Dès les années 1978 des phénotypes dus aux mutations *uvr* ont été découverts (Sinden and Cole 1978; Seeberg 1978).

Les liaisons covalentes entre deux bases d'ADN nécessitent un processus de réparation séquentiel impliquant une excision de l'ADN affecté. Les gènes *uvr* participent à l'élimination des ICL en éliminant la lésion. Les protéines UvrABC reconnaissent les lésions générée par les adduits. Sans UvrABC, pour pouvoir réparer les ICL associées au psoralène, la cellule utilise la recombinaison homologue, nécessitant dans ce cas *recA*, *recB*, *recF* et *recN* et des régions du génome en plusieurs copies (Cupido and Bridges 1985).

4.7.1 Organisation du complexe UvrABCD

UvrA appartient à la superfamille d'ATPases « cassettes d'attachement ATP » (ABC) (Doolittle et al. 1986). L'hydrolyse de l'ATP par UvrAB sert à la dissociation d'UvrA du complexe UvrAB-ADN et se produit indépendamment de l'hydrolyse de l'ATP par UvrB. L'hydrolyse de l'ATP par UvrA n'est pas essentielle, mais facilite la formation du complexe UvrB-ADN, (Kraithong, Sucharitakul, et al. 2021). UvrC est une endonucléase qui va s'associer avec le complexe UvrB-ADN. Cette association va permettre de réaliser des incisions de part et d'autre de la lésion. UvrD, est une hélicase II permettant l'excision du brin incisé.

4.7.2 Fonctionnement du NER

La voie du NER permet de reconnaître un grand nombre de lésions qui modifient la courbure de la double hélice de l'ADN (Houten 1986). Le complexe tétramérique UvrA₂B₂ scanne, en cheminant, l'ADN en double hélice jusqu'à trouver une distorsion (Pakotiprapha et al. 2009). Puis UvrB recrute UvrC et incise le squelette de l'ADN en amont et en aval de la lésion. UvrC coupe une portion de 6 nucléotides de part et d'autre des sites de la lésion (Sinden and Cole 1978; T.Reardon 2004). Il a été démontré qu'une endonucléase supplémentaire (le produit du gène *ydjQ* - ou Cho pour UvrC Homologue) partage une homologie de séquence significative avec la moitié N-terminale d'UvrC et agit conjointement avec UvrA et UvrB pour réaliser l'incision 3' au niveau de la neuvième liaison phosphodiester 3' à la lésion mais ne peut pas réaliser l'incision 5'. La délétion de Cho n'a aucun effet mesurable sur la survie aux UV et n'a qu'un effet mineur sur *E. coli* dépourvue de la protéine UvrC. Cho, travaille en collaboration avec UvrC (Moolenaar et al. 2002).

Selon les modèles admis, le segment incisé avec la lésion et UvrC ou Cho est retiré à la suite du passage de l'hélicase II : UvrD. La portion d'ADNsb qui en résulte est re-synthétisée par l'ADN polymérase I et scellée par une ligase. Voir

Figure 28. Cette structure peut également être le substrat de recombinaison homologue ou générer des cassures doubles brins si la fourche de réplication traverse la portion d'ADNsb.

Si on considère un ICL de MMC touchant deux portions d'ADN complémentaire, bien qu'excisé du premier brin, il reste toujours rattaché au brin complémentaire, que ce passe-t-il ensuite ? Il est possible que l'ADN polymérase translésionnelle synthétise le brin complémentaire sur une matrice peu praticable au point de l'adduit, puis une deuxième excision par le NER élimine définitivement la portion d'ADN affecté par l'adduit ; ce qui impliquerait une seconde synthèse.

Une autre possibilité serait un système qui vienne éliminer la base fusionnée telle que la protéine YcaQ. Chez *E. coli* c'est une ADN glycosylase alkylpurine qui élimine les liaisons covalentes entre brins d'ADN (Bradley et al. 2020).

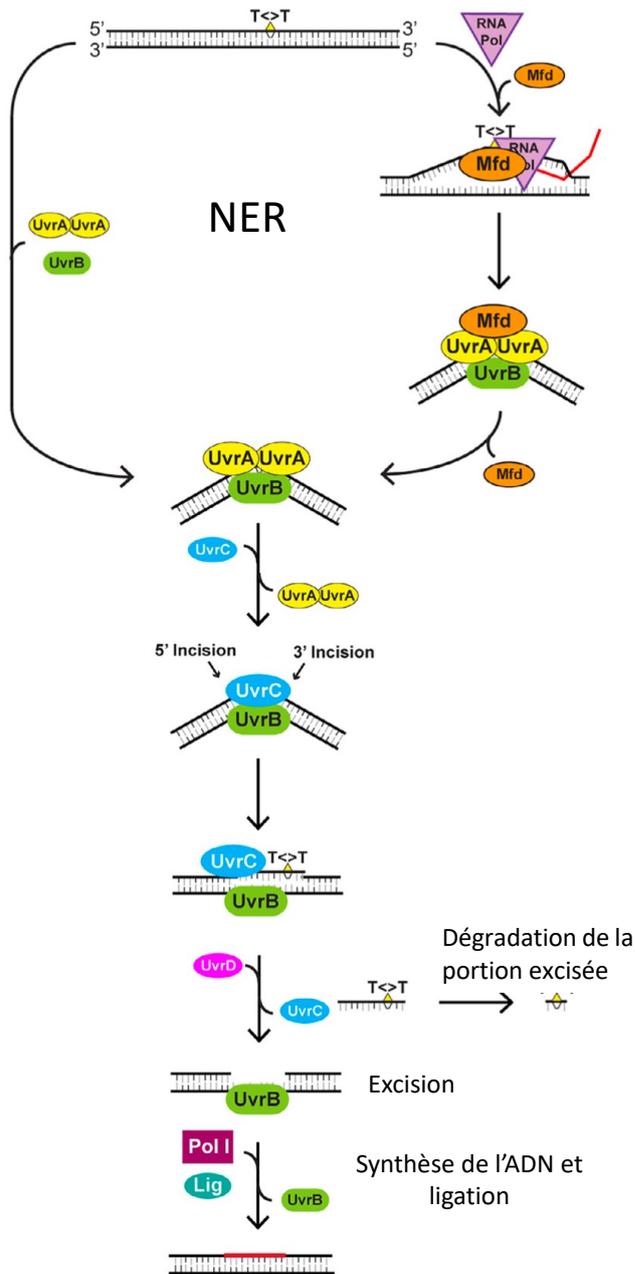


Figure 28 Représentation schématique de la voie du NER

Durant la réparation globale du génome, le génome est scanné par l'hétérotétramère UvrA₂ – UvrB₁, jusqu'au site de la lésion, qui est repérée par un changement de conformation important de la double hélice. Le processus de réparation est initié sur des gènes activement transcrits grâce à l'interaction entre l'ARN polymérase et Mfd, qui va pouvoir recruter un dimer d'UvrA, ou un hétérotétramère UvrA₂-UvrB au site de lésion. Les deux mécanismes vont conduire à la même voie de réparation. UvrB va confirmer la lésion puis UvrC va catalyser les incisions en 3' et 5'. L'ADN incisé est excisé par l'hélicase UvrD qui élimine la portion d'ADN portant la lésion qui va ensuite être dégradée. La réparation est terminée après la synthèse du patch de réparation par l'ADN polymérase I et la fermeture de l'entaille par l'ADN ligase. Figure empruntée à (Kisker, Kuper, and Van Houten 2013).

Les liaisons croisées ADN-protéines peuvent interférer avec la progression des ADN polymérasés et perturber le processus de réplication ainsi que de transcription. Chez *E. coli*, le blocage des fourches de réplication peut déclencher la réponse SOS. Une étude montre que le NER favorise le traitement des liaisons croisées ADN-protéine dans le brin transcrit ; UvrA, UvrB et Mfd peuvent interférer avec les liaisons croisées ADN-protéine de petite taille mais seule UvrA peut interférer avec les liaisons croisées ADN-protéine de grande taille dans le brin transcrit traité par HR (Fang 2013).

4.7.3 Le NER permet de ré-amorcer la transcription

Il existe une deuxième voie impliquant les protéines UvrABC, elles permettent également à la machinerie de transcription de redémarrer. Il s'agit de la réparation couplée à la transcription (TCR). Pour cette voie, l'événement initiateur est l'arrêt de la transcription au site d'une lésion (Mellon and Hanawalt 1989). La protéine, Mfd sert de senseur et retire l'ARN polymérase bloquée sur l'ADN (faisant ainsi avorter le transcrit naissant). Mfd recrute UvrA pour procéder aux mêmes étapes que pour le NER. Grâce à cette voie, les lésions sur les brins transcrits sont réparées plus efficacement que celles sur les brins non transcrits (Hanawalt 2002).

Une deuxième voie de TCR fonctionne lorsqu'un ICL ou un adduit sur le brin matrice provoque le blocage du complexe d'élongation de la transcription ; la lésion inhibe la transcription et entrave le mouvement des fourches de réplication de l'ADN. Au cours du TCR, l'ARN Polymérase bloquée et le transcrit naissant, sont retirés de la matrice d'ADN et le complexe UvrA ou UvrA₂B₂ est chargé sur l'ADN pour initier la réparation. Selon le modèle le génome entier est transcrit. Dans cette optique, l'ARN Polymérase devient un senseur de dommages à l'ADN (Kraithong, Hartley, et al. 2021; Ghodke, Ho, and van Oijen 2020).

Un troisième modèle a été proposé, impliquant UvrD pour le TCR. Dans ce modèle UvrD se lie à l'ARN polymérase bloquée en présence du facteur d'élongation de la transcription NusA et de ppGpp et induit un retour en arrière pour exposer la lésion, ceci serait suivi par la reconnaissance de la lésion par les protéines NER (Epshtein et al. 2014).

Une étude récente propose une vision complètement différente du TCR. Contrairement à la vision conventionnelle, le TCR serait responsable de la grande majorité des

événements de réparation chromosomique impliquant le NER ; c'est-à-dire que le TCR domine complètement la réparation génomique globale. L'ARN polymérase (RNAP) sert de capteur primaire des dommages à l'ADN et agit comme une plateforme pour le recrutement des enzymes NER. UvrA et UvrD s'associent à la RNAP de façon continue, formant une pré-TCRC de surveillance. Dans ce modèle, le TCR serait largement indépendant de Mfd. Mfd jouerait un rôle indirect: il participerait à l'élimination des RNAP obstructives, ainsi qu'à la reprise d'activité par la RNAP, par un déplacement en arrière, après réparation (Bharati *et al*, 2022).

4.8 La recombinaison homologue

La recombinaison homologue (RH) est un mécanisme universel, conservé dans les trois domaines du vivant. C'est une réparation post-répllicative (Clark 1971), qui utilise un modèle homologue pour restaurer l'information génétique perdue ou contourner les lésions de réplication (Lusetti and Cox 2002). Ce processus permet de copier une séquence d'ADN à partir d'une molécule d'ADN intacte. Les protéines principales impliquées dans la RH sont RecA pour les bactéries, RadA pour les archées et Rad51 pour les eucaryotes. Trois types de dommages peuvent être réparés par recombinaison homologue : une fourche de réplication cassée, une cassure double brin franche et une portion d'ADNsb sur de l'ADNdb. La RH la voie de réparation la plus fidèle permettant la réparation des CDB (Kowalczykowski *et al.* 1994). Chez certaines bactéries qui ne possèdent pas de système de réparation par le « Non Homologous End Joining » (NHEJ), la RH est la seule voie permettant la survie suite à une CDB. La RH est également essentielle pour réparer efficacement les portions d'ADNsb. Quelle que soit l'origine de la lésion, pour que la recombinaison homologue fonctionne, il faut que la cellule dispose d'une séquence homologue à la région endommagée. Chez *E. coli* des régions homologues de quelques dizaines de paires de bases peuvent suffire, mais de manière courante la recombinaison homologue implique des régions de plusieurs Kb. Bien qu'*E. coli* soit considérée comme haploïde, plusieurs copies de son unique chromosome peuvent être présentes au même moment (Dewachter *et al.* 2018; Cooper and Helmstetter 1968). Une ploïdie transitoire, la présence d'une chromatide sœur dupliquée, ou un locus répété, permet à *E. coli* d'avoir plusieurs substrats pour réaliser la RH.

La RH est une réponse en plusieurs étapes qui dépend de la polymérisation de la recombinase RecA sur l'ADNsb. Deux voies distinctes mènent à la formation de ce substrat : la voie RecBCD et la voie RecFOR.

4.8.1 RecBCD une des voies majeures permettant d'initier la RH

RecBCD est un large complexe protéique (330 kDa) avec des propriétés d'ouverture du duplex d'ADN (hélicase) et d'hydrolyse de l'ADN (nucléase). Sa découverte s'est faite grâce à l'observation de mutants déficients en recombinaison, *recA*, *recB* et *recC* (Clark and Margulies 1965; Howard-Flanders and Theriot 1966). Il y a environ 10 à 50 molécules de RecBCD par cellule, l'expression des gènes est constitutive. RecBCD devient fonctionnel lorsqu'une molécule d'ADN est scindée en deux (CDB) (Taylor and Smith 1985) ou lorsque de l'ADN linéaire est présent dans la cellule, par exemple lors de la conjugaison (Dillingham and Kowalczykowski 2008). Il y a plusieurs sources de CDB que RecBCD prend en charge, voir

Figure 29. Des CDB peuvent apparaître directement sur l'ADN suite à l'activité d'endonucléases, de nombreuses sont produites par les bactéries pour se débarrasser d'ADN étranger ou par les phages pour endommager le génome de l'hôte par exemple. Les CDB peuvent également apparaître en réponse à des radiation ionisantes. Les CDB peuvent aussi apparaître au passage de la fourche de réplication sur une portion d'ADNsb (Kouzminova and Kuzminov 2004). Les fourches de réplication bloquées sur l'ADN peuvent être sauvées par une étape de réversion de fourche qui génère une extrémité double brin (Michel et al. 2007) pour permettre la ré-initiation de la réplication.

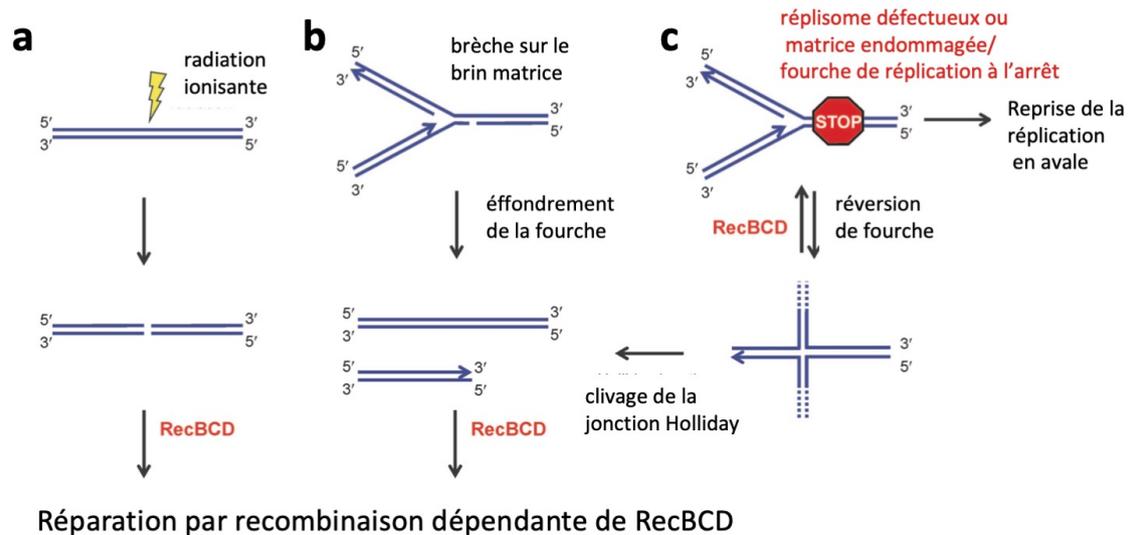


Figure 29 Réparation dépendant de RecBCD

a. Les CDB peuvent être formées par des agent génotoxiques tel que les radiations ionisantes ou les endonucléases. b. Si la fourche de réplication rencontre une portion d'ADNsb, un bras va se détacher et générer une CDB. C'est l'effondrement de la fourche de réplication. c. A la suite de l'arrêt de la fourche de réplication par un adduit, ou un élément défectueux dans le réplisome, ou la fusion de protéines à l'ADN. Soit la réplication reprend en aval de la lésion sans réparation directe, soit la fourche de réplication « en pied de poulet » va produire une réversion de réplication pour former une jonction de Holliday. Dans ce cas, la portion libre de la jonction Holliday peut être dégradée par RecBCD pour reformer une fourche viable et permettre au réplisome de se réassembler. La réplication peut également continuer après la réparation de l'ADN en résorbant la jonction de Holliday et reformer une fourche. La jonction de Holliday peut aussi être clivée par le complexe RuvABC pour produire une CDB. Figure empruntée à (Dillingham and Kowalczykowski 2008)

RecBCD est à la fois une hélicase et une nucléase. Il se charge sur la cassure et permet d'ouvrir l'ADN double brins tout en dégradant l'ADN simple brin ainsi généré. RecBC forment l'exonucléases V, ATP dépendantes. RecB possède également un domaine de chargement de RecA. Quand RecBCD rencontre un site Chi à proximité d'une CDB, le complexe va arrêter de dégrader les deux brins d'ADN et se mettre à dégrader un unique brin de façon processive. Les premières protéines à s'associer à l'ADN nue sont les SSB, protégeant l'ADN d'autres nucléases et lui évitant de se refermer sur lui-même. RecA va très vite remplacer SSB sur ces segments de plus de 30 kbp (Wu 1982). Il permet ainsi de générer le substrat de l'induction de la réponse SOS et de permettre la RH. Le processus de RecBCD est décrit **Figure 30**.

Les séquences Chi modulent le fonctionnement de RecBCD, ce sont des séquences octa-nucléotidiques régulatrices (5'-GCTGGTGG-3'). Elles sont au nombre approximatif de 1000 réparties sur l'ensemble des 4.6 Mb du chromosome d'*E. coli* (Smith 2012). Chi signifie : "crossover hot spot instigator" ou l'instigateur de point chaud de recombinaison.

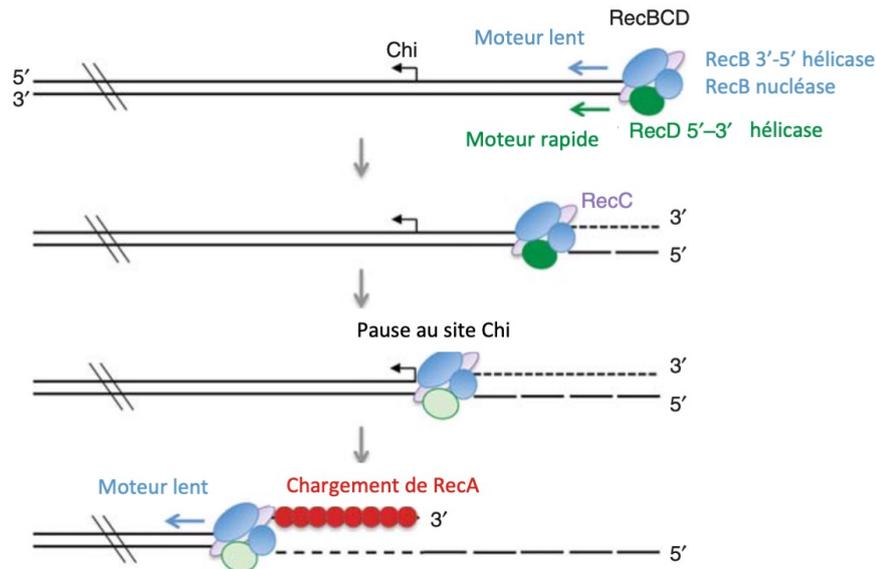


Figure 30 Processus de résection de RecBCD

Traitement des extrémités par le complexe RecBCD. RecBCD se charge aux extrémités d'ADNdb et se transloque sur les deux brins en utilisant les sous-unités hélicases RecD et RecB. RecB dégrade les deux brins d'ADN sortant du complexe, RecBCD s'arrête à un site Chi, et la sous-unité RecD est modifiée ; la translocation continue est conduite par l'hélicase RecB. Après la reconnaissance du Chi, RecB dirige le chargement de RecA sur l'extrémité 3' et dégrade uniquement le brin 5'. Figure empruntée à (Symington 2014).

RecBCD est également essentiel dans divers mutants de réplication tels que *rep*, *priA* ou affectés pour différentes sous-unités de l'ADN polymérase III. Dans ces souches, les fourches de réplication à l'arrêt génèrent des extrémités ADNdb par reversion de la fourche de réplication. RecBCD fournira donc un chemin alternatif pour redémarrer les fourches de réplication arrêtées (Michel, Sinha, and Leach 2018).

Un des autres rôles protecteurs du système de RecBCD, est sa capacité à dégrader directement les génomes de phages, tels que Lambda ou T4, qui contiennent des extrémités d'ADN libres. En effet, tout phage qui expose des extrémités d'ADN libres dans le cadre de son cycle doit trouver un moyen d'échapper à la dégradation par la RecBCD (Behme, Lilley, and Ebisuzaki 1976). Le phage Lambda a évolué pour réussir à détourner le système RecBCD afin que son génome d'ADNdb linéaire ne soit pas dégradé dès l'entrée dans la cellule. Le système *lambda red* comporte trois protéines clés, Exo, Beta, Gam. Les trois sont nécessaires pour permettre la recombinaison dans le génome à partir d'un substrat d'ADNdb linéaire. Gam empêche les nucléases endogènes RecBCD et SbcCD de digérer l'ADN linéaire introduit dans

E. coli. Exo est une exonucléase 5'→3' ADNdb-dépendante. Bêta protège l'ADNsb créé par Exo et favorise sa réunion avec une cible d'ADNsb complémentaires. Seule l'expression de Beta est nécessaire pour la recombinaison avec un substrat oligo d'ADNsb (Murphy, 2016).

Ce système a été extrait de son cadre biologique pour être utilisé comme un outil en biotechnologie, afin de créer facilement des mutants en recombinant des produits de PCR linéaires ne présentant que 40 - 50 pb d'homologie sur le chromosome (Datsenko and Wanner 2000; Yu et al. 2000). Couplé au système CRISPR-Cas9, l'outil *Lambda* red permet d'envisager les projets les plus sophistiqués de biologie de synthèse tel que le remplacement de larges régions (> 200 kb) d'un génome bactérien par de l'ADN de synthèse (Robertson *et al*, 2021).

Lorsque RecBCD est engagé sur une CDB et que la suite du processus de recombinaison n'est pas opérationnelle, dans un mutant *recA* par exemple, l'intégralité de la molécule d'ADN (le chromosome entier) peut être dégradée. On parle de « reckless DNA degradation » (Capaldo & Barbour, 1975).

4.8.2 RecFOR la seconde voie permettant la RH

Une seconde voie de recombinaison homologue a été mis en évidence en isolant des pseudo-révertants des doubles mutants $\Delta recBC$. La voie recFOR (Clark 1973) intervient lors de brèches sur un unique brin d'ADN formant des portions d'ADNsb.

Les protéines RecF, RecO et RecR fonctionnent en complexe. Ce sont des protéines médiatrices de la recombinaison, elles interviennent sur l'étape pré-synaptique de la RH. Elles permettent la polymérisation de RecA sur des segments d'ADNsb recouvert de SSB, inclus dans de l'ADNdb (Cejka 2015; Lenhart et al. 2014). Ces portions d'ADNsb peuvent provenir de défauts de réplication mais aussi correspondre à des intermédiaires de réparation de lésions par le NER ou le mismatch repair (Buljubasic et al. 2012).

Le système RecFOR peut éventuellement commencer pour un défaut du système RecBCD et participer à la réparation des CDB. Chez un mutant *recBC sbcB sbcC*, la réparation des DSB via la voie RecFOR nécessite trois protéines présynaptiques supplémentaires : RecN, RecQ, et RecJ (Lovett and Clark 1984; Nakayama, Irino, and Nakayama 1985; Picksley, Attfield, and Lloyd 1984). Les mécanismes de ce chemin restent inconnus.

RecFOR joue également un rôle lors de l'arrêt de la fourche de réplication, il traite le brin retardé naissant, permettant ainsi la stabilisation de la fourche de réplication jusqu'à la réparation des dommages (Courcelle and Hanawalt 1999; Lenhart et al. 2014).

En amont de la voie RecFOR, les enzymes RecQ et RecJ participent à l'initiation du processus. Elles ont un rôle similaire à RecBCD, d'hélicase et de nucléase pour générer de l'ADNsb, mais à partir d'une extrémité d'ADNsb au cœur d'un ADNdb et non plus à partir d'une cassure double brin. RecQ et RecJ agissent sur une extrémité d'ADNsb (Persky and Lovett 2008). RecQ est une hélicase qui ouvre l'ADNdb dans le sens $3' \rightarrow 5'$, l'exonucléase RecJ peut alors dégrader l'ADN dans le sens $5' \rightarrow 3'$ grâce à la l'interaction avec SSB associée à l'ADNsb (Lovett and Kolodner 1989). RecJ est une exonucléase processive, spécifique de l'ADNsb, et dégrade la portion de $5' \rightarrow 3'$. Elle permet d'étendre la portion d'ADNsb, favorisant d'avantage la portion pris en charge par RecFOR, et facilitant la recherche d'homologie (Morimatsu & Kowalczykowski, 2014). Pour être efficace, RecJ a besoin d'une queue en $5'$ de 7 nucléotides, le phosphate n'est pas requis. L'association préliminaire des SSB augmente l'efficacité de RecJ (Han et al. 2006). A l'inverse de RecBCD, l'activité de RecQJ n'est pas régulée par les séquences Chi (Harmon, DiGate, and Kowalczykowski 1999). RecJ est requise pour la reprise de la synthèse de l'ADN après l'arrêt de la réplication (Courcelle et al. 2006). RecQ annule les possibles recombinaisons illégitimes qui se produisent via les régions d'homologie courtes (Hanada et al. 1997). Outre le rôle de RecJ dans la réparation de l'ADN par RH, elle permet également de dégrader l'ADNsb exogène (une fois que ce dernier a été capturé par la cellule), cela permet de récupérer une sources nucléotides (Palchevskiy and Finkel 2009).

Dernièrement, il a été découvert que RecBCD est également impliqué dans la voie de réparation des brèches sur un unique brin d'ADN (Pages 2016). Les voies RecBCD n'agirait pas comme une voie de secours en l'absence de RecF (comme RecF le fait en l'absence de RecB), mais serait directement impliquées dans la réparation des portions simple brin. En effet l'inactivation de RecB entraîne une diminution du taux de réparation des portions simple brin, même en présence d'une voie RecF pleinement fonctionnelle.

Une autre voie de recombinaison indépendante des protéines RecBCD et RecFOR, a été mis en lumière, elle est active dans les mutants *sbcB15 sbcC(D)* d'*E. coli* (Buljubasic et al. 2019). Les gènes *sbcC* et *sbcD* forment un opéron (Gibson, Leach, and Lloyd 1992). SbcB est une Exonuclease I (ExoI) qui hydrolyse l'ADN par une activité exonucléase 3'->5' (Lehman and Nussbaum 1964). SbcC est un membre de la famille des protéines de structure et maintenance du chromosomes (Sharples and Leach 1995). L'activité d'ExoI de SbcD supprime les recombinaisons illégitimes induites par RecE (Yamaguchi et al. 2000). Le complexe SbcCD est important pour la stabilité génomique. Il dégrade les intermédiaires structurels palindromiques formant des « épingles à cheveux », ce qui peut se produire quand deux fourches de réplifications convergent (par exemple au *ter*) (Leach, Okely, and Pinder 1997; Sinha, Possoz, and Leach 2020). SbcCD permet l'entrée de RecBCD sur une portion d'ADNsb en 3' afin de faciliter la résection (Wendel et al. 2018).

De manière intéressante il a été démontré que lorsque un fragment d'ADNsb n'est pas réparés par l'un ou l'autre de ces chemins, les cellules sont toujours capables de se diviser mais perdront la chromatide endommagée (Laureti et al. 2015).

4.8.3 Le processus de recombinaison

Chez *E. coli*, et d'autres bactéries, la RH est catalysé par la protéine RecA. Durant le processus de RH, RecA polymérise et forme un filament nucléoprotéique autour de l'ADNsb, le principal intermédiaire de recombinaison (Cox and Lehman 1981). La formation d'ADNsb est médié par RecBCD et/ou RecFOR. Les protéines médiatrices jouent un rôle crucial en aidant RecA à s'imposer face aux SSB lors de la compétition pour l'ADNsb. La protéine SSB elle-même facilite la recombinaison indirectement, en stabilisant l'ADNsb, en l'empêchant de former des structures secondaires ou d'être dégradé (Kowalczykowski et al. 1987).

Chaque RecA recouvre 3 nucléotides. Elle est structurellement composée de deux zones, une se lie à l'ADNsb, l'autre permet de scanner l'autre l'ADNdb. Quand une homologie suffisante est trouvée, soit un minimum requis de 20 à 30 pb (Shen and Huang 1986), RecA peut catalyser l'invasion de branche (Wu 1982), formant ainsi une portion d'ADN à 3 brins superposé : la boucle-D, y compris avec une homologie imparfaite (Clark 1973; Persky and Lovett 2008). Cette réaction peut être divisée en deux phases, la formation de courtes régions

hétéroduplex (D-loops) et l'extension des D-loop par migration des branches (Cox and Lehman 1981).

La Cryo-microscopie électronique donne une image extrêmement précise de ces étapes à l'échelle atomique. Les brins d'ADNdb sont séparés lors de la liaison avec le filament de RecA. Un brin est séquestré tandis que l'autre est libéré pour échantillonner l'appariement avec l'ADNsb. L'homologie, par la formation d'hétéroduplex, favorise l'ouverture de l'ADNdb. L'absence d'homologie la supprime, en maintenant les synapses locales courtes afin que de multiples synapses puissent se former et en augmentant la probabilité de rencontrer une homologie (Yang & Pavletich, 2021).

RecA initie l'échange de brin avec les chromatides sœurs pour former des intermédiaires de recombinaisons que l'on nomme les jonctions d'Holliday (HJ). Les HJ sont formées par quatre brins d'ADN lors la recombinaison génétique. Ils forment des crossing-over, où le brin coupé, envahit la chromatide sœur à la recherche d'homologie. Ensuite la section manquante va être synthétisée par complémentation. Les HJ seront éliminées ou résolues par l'intervention d'endonucléases RuvABC voir le schéma récapitulatif **Figure 31**.

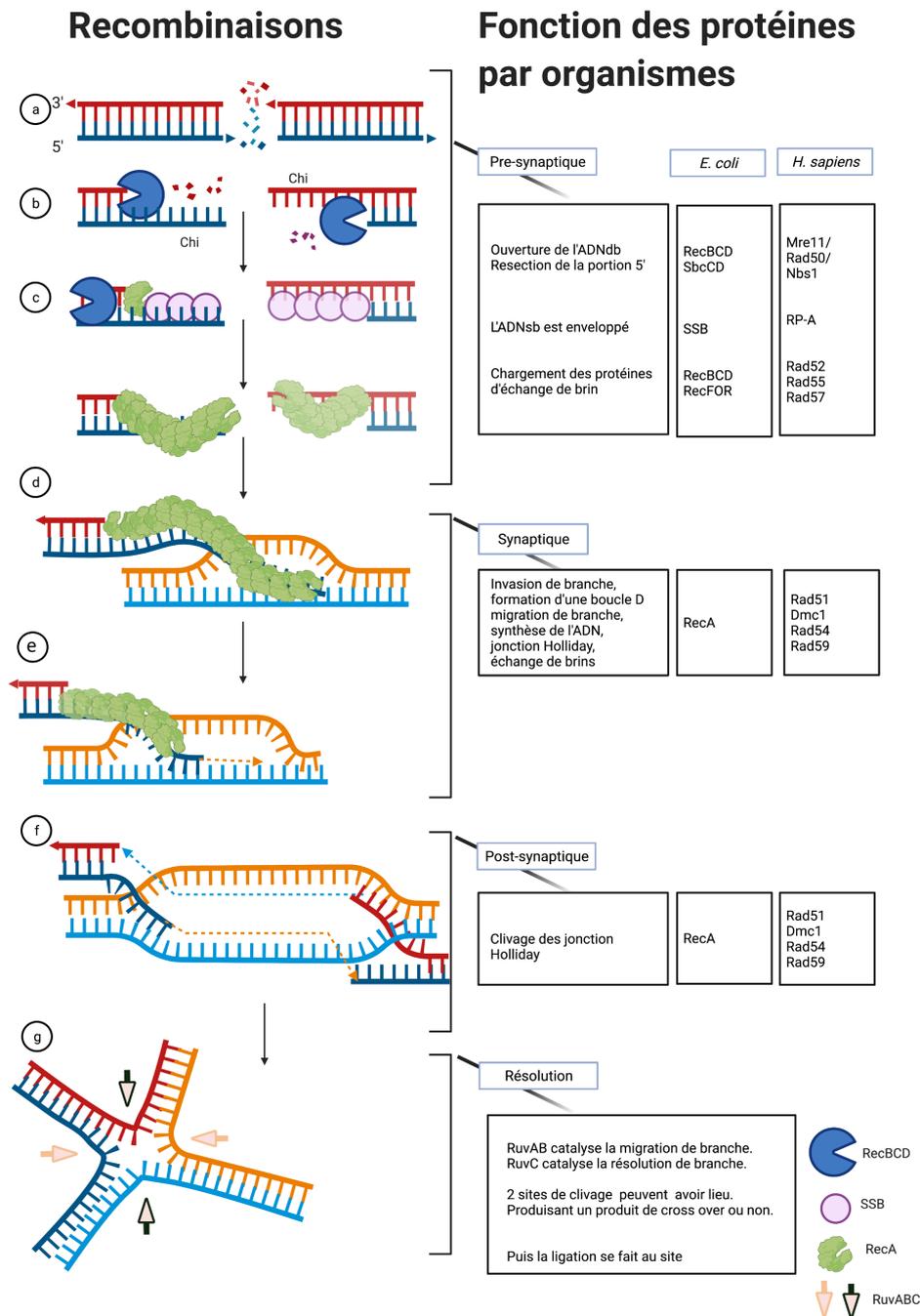


Figure 31 Étapes de la Recombinaison Homologue

a. L'étape pré-synaptique commence par la résection de l'ADNdb à un site d'une cassure double brin. RecBCD (pacman bleue) va dégrader la portion 5'. b. RecBCD dégrade un seul brin à partir du site Chi. c. Les SSB (cercles rose) se lie à l'ADNsb et ainsi, RecA (globule vert) va pouvoir commencer à former un nucléofilament puis chercher une homologie de séquence nucléotidique. d. Une fois l'homologie trouvée, c'est l'étape synaptique avec l'invasion de branche par RecA. e. Le triplex d'ADN associé à RecA forme une D-loop, lorsque l'homologie est trouvée, il y a synthèse de l'ADN f. Étape Post-synaptique, l'ADN est resynthétisé à partir des homologies trouvées g. Étape de résolution par RuvABC (flèches pleines) qui permet d'avoir deux brins d'ADN réparés.

Une autre hélicase joue un rôle important dans les dernières étapes de la RH, RecG (Rudolph *et al*, 2010). La protéine RecG d'*E. coli* est une translocase d'ADN double brin qui déroule une variété d'ADN ramifiés *in vitro*, y compris les jonctions de Holliday, les fourches de réplication, les D-loops et les R-loops. Par exemple en présence de BLM, les enzymes de traitement de la jonction de Holliday RecG et RuvC sont toutes deux nécessaires à la survie et semblent participer à la même voie épistatique (Kosa *et al*. 2004). RecG contient un domaine de reconnaissance de fourche lui permettant de se lier à de l'ADN ramifié, ainsi qu'un moteur ATPase de la superfamille II (SF2) qui conduit la translocation sur l'ADNdb. Lorsque RecG se lie aux jonctions de Holliday elle les résout en favorisant la migration des branches dans un processus appelé "extrusion des brins". Outre sa capacité à faire migrer les jonctions Holliday, il a été démontré que RecG s'oppose à l'échange de brins médié par la RecA *in vitro* (Whitby and Lloyd 1995). RuvC est une endonucléase qui se lie aux HJ et les clivent et permet ainsi de finaliser la RH.

RecG catalyse également le renversement des fourches de réplication bloquées en réponse au stress de réplication chez les bactéries (Warren *et al*. 2018). L'inactivation de RecG sensibilise les cellules à la MMC, ainsi qu'aux UV et aux rayonnements ionisants, et conduit à la réplication excessive du terminus de réplication (Rudolph *et al*, 2013). La justification moléculaire de la sur-réplication du *ter* viendrait de la génération de structures d'ADN nécessaires au redémarrage de la réplication par PriA ou à la réparation par recombinaison par les mécanismes RecA/RecBCD ou RuvABC (Warren *et al*. 2018).

4.9 La réparation non homologue par jonction des brins (NHEJ)

La jonction non homologue des extrémités (NHEJ) est un processus de réparation des CDB qui ne nécessite aucune homologie. Il s'agit d'une ligation directe, potentiellement mutagène, des deux extrémités cassées de l'ADN (Fell & Schild-Poulter, 2015). L'absence chez *E. coli* K12 des protéines Ku, qui sont essentielles au processus, à longterm donné l'impression que ce système n'existait que chez les bactéries. Il est maintenant clair que le NHEJ existe et est fonctionnel chez de nombreuses bactéries y compris certaines *E. coli* (Amare *et al*, 2021). Bien qu'absent de *E. coli* K12 l'expression des protéines du NHEJ d'un phage permet d'augmenter la résistance de K12 à certains agents génotoxiques (Bhattacharyya *et*

al, 2018). La prise en compte du NHEJ dans l'arsenal disponible chez les bactéries pour survivre aux lésions génotoxiques et donc évoluer par mutagénèse est importante.

4.10 Les ADN polymérase translésionnelles (TLS).

Ces polymérases spécialisées sont capables de contourner les lésions de l'ADN matrice, un processus connu sous le nom de synthèse translésionnelle. Les lésions courantes comprennent les sites abasiques, les bases alkylées, les bases oxydées et les adduits. Cependant, cela les rends également sujettes à des erreurs d'incorporation de nucléotides. Ces polymérases n'ont pas d'activité de relecture, et quand elles rencontreront une lésion sur le brin matrice, elles ne s'arrêtent pas, elles passeront outre la lésion en intégrant une base aléatoirement. L'insertion d'une base incorrecte peut entraîner l'apparition d'une mutation lors des cycles de réplication suivants (Henrikus, van Oijen, and Robinson 2018).

La synthèse translésionnelle (TLS) fait partie des dernières parades pour la survie de la cellule. Les gènes codant pour les polymérases translésionnelles sont généralement induits en fin de réponse SOS, on peut penser que la cellule interprète que la persistance des lésions est trop importante et que les lésions doivent donc être outre-passées coûte que coûte (Maslowska *et al*, 2019). Les ADN polymérases translésionnelles vont remplacer l'ADN polymérase III pour répliquer les régions autour des lésions. Il y a chez *E. coli* l'ADN polymérase IV : DinB (Din pour : « *damage inducible* ») et l'ADN polymérase translésionnelle V : UmuCD (Umu pour UV « *mutagenesis* »). Le modèle le plus connu est celui de TLS répliatif, les polymérases TLS aident les réplisomes bloqués en remplaçant l'ADN Polymérase III arrêtée et en contournant la lésion (Fuchs 2016). Lors d'un stress génotoxique aigu la temporalité de la mobilisation des acteurs peut changer et le système bactérien peut donner la priorité à la TLS (Naiman *et al*. 2014). Par leurs actions mutagènes, les polymérases TLS sont facteur de diversité génétique. L'équilibre entre TLS « error prone » et RH « error free » détermine la réponse aux stress génotoxiques accompagnant les différentes lésions du génome. De nombreux points de dialogue entre les deux systèmes existent donc, notamment entre RecA et UmuCD (Fujii & Fuchs, 2020).

5 RecN est un acteur essentiel et pourtant encore mal connu des réponses aux stress génotoxiques

Jusqu'en 1988, *radB* et *recN* étaient considérés comme deux gènes distincts. Ces deux gènes identifiés séparément, et étudiés parallèlement par différentes équipes, étaient en réalité un seul gène maintenant appelé *recN* (Sargentini and Smith 1988). Le mutant *recN* montre une sensibilité accrue aux CDB provoquées par la MMC et les rayons-X (Picksley, Attfield, and Lloyd 1984; Picksley, Morton, and Lloyd 1985). Il a été déterminé que *recN* était sous le contrôle de LexA grâce à la fusion de *recN* avec *lacZ* (Picksley, Morton, and Lloyd 1985) et s'inscrivait donc dans la réponse SOS. Il a été confirmé que le simple mutant de *recN* était particulièrement sensible à toutes les sources de CDB (aux radiations ionisantes, ainsi qu'aux agents génotoxiques tels que la MMC, la BLM) (Sargentini and Smith 1986; Robert G. Lloyd 1988). Un phénotype de sensibilité aux UV a pu être décrit en absence de RecN dans une souche *recBC sbcB* (Lloyd 1983), ce qui n'est pas le cas pour le simple mutant *recN*. L'induction de RecN par la MMC ou les UV conduit à une réorganisation rapide du nucléoïde qui passe d'une forme bilobée à une forme mono lobée, éventuellement sphérique, compacte au centre de la cellule (Odsbu and Skarstad 2014).

En dehors des systèmes de réparation, la mutation *recN* réduit l'efficacité de la recombinaison par conjugaison (dans un triple mutant *recBC sbcC*) démontrant également son rôle dans l'acquisition de gènes et la plasticité génétique (Lloyd 1983; Picksley, Attfield, and Lloyd 1984; Rostas et al. 1987).

5.1 La structure de RecN

La protéine RecN d' *E. coli* fait 567 acides aminés et pèse 61 kDa (Finch, Chambers, and Emmerson 1985). RecN appartient à la famille des protéines SMC (Structural Maintenance of Chromosome) qui inclue les cohésines, les condensines, les protéines Rad50 et ScpB, impliquées dans la réparation de l'ADN. RecN est toutefois plus petite que la plupart des SMC. En effet, un monomère de RecN fait 190 Å de long, structuré par une petite région centrale hélicoïdale. Généralement dans cette région, les SMC comptent 900 à 1500 AA contre 240 pour RecN. Chaque extrémité C-ter et N-ter, porte un domaine globulaire, incluant un motif Walker A et un motif Walker B typique des protéines SMC. Ces deux motifs interviennent dans

l'hydrolyse de l'ATP. La structure de RecN *d'E. coli* (RecN_E) n'a pas été résolue. Elle a été inférée à partir de fragments de RecN de *D. radiodurans* (RecN_D) (Pellegrino et al. 2012). Dans sa forme active, RecN forme un homo-dimère stable prenant l'allure d'un « V ». Les deux domaines Walker se retrouvent alors face à face, permettant à l'homo-dimère de s'associer à l'ADN. La structure reconstituée de RecN est présentée **Figure 32**.

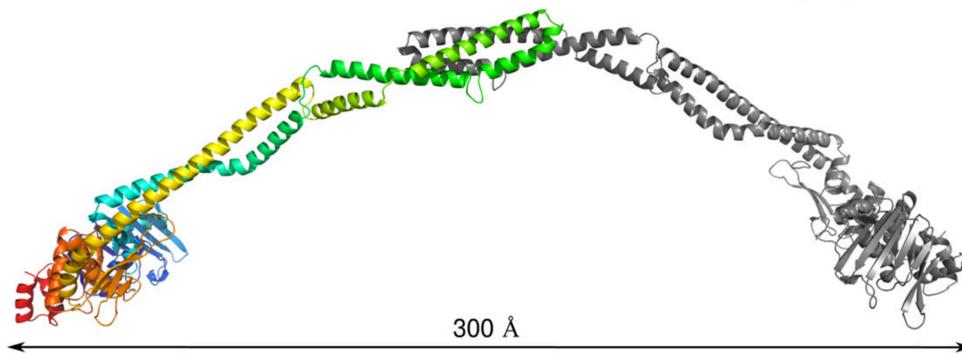


Figure 32 Modèle de RecN_D

Architecture de la longueur totale de RecN. Une molécule du dimère est colorée en arc-en-ciel, en partant de l'extrémité N (bleu clair) vers l'extrémité C (rouge), tandis que l'autre est colorée en gris pour plus de clarté. Figure empruntée à (Pellegrino et al. 2012)

Il est intéressant de souligner que RecN présente aussi une très forte homologie avec UvrA, UvrB, UvrD, RecA, RecB, RecD, au niveau des résidus de 27 à 43 et avec RecA seulement au niveau des résidus 355 et 363. Ces régions sont impliquées dans l'hydrolyse de l'ATP et l'association à l'ADN de ces protéines (Rostas et al. 1987).

5.2 RecN est de type SMC like

La maintenance du génome nécessite divers facteurs associés aux nucléoïdes, par mis eux les protéines appartenant à la famille des SMC. Elles agissent comme organisatrices des chromosomes, et peuvent lier ou faire des ponts entre des segments d'ADN distants et ainsi changer l'architecture et produire des microstructures (Kamada and Barilla 2018). La liaison et l'hydrolyse de l'ATP induisent de petits changements de conformation de la tête globulaire. L'activité ATPase pourrait servir de moteur de déplacement sur l'ADN ou pourrait être responsable du contrôle de l'état de dimérisation des domaines des tête, qui à leur tour peuvent réguler la liaison et la libération de l'ADN (Graumann and Knust 2009). L'architecture de certaines SMC est présenté **Figure 33**.

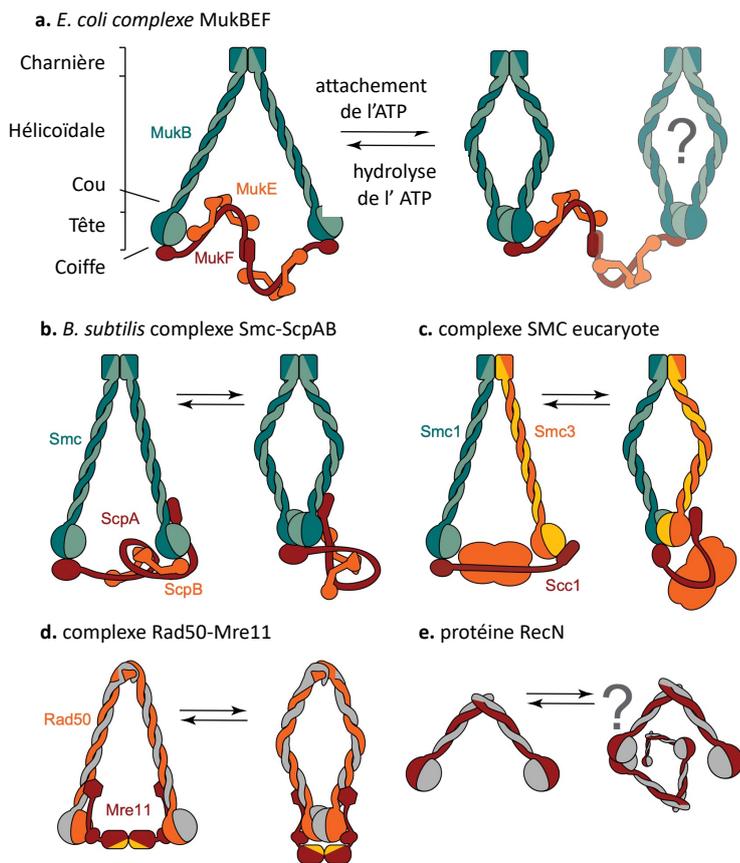


Figure 33 Architecture des complexes SMC

Les protéines SMC sont composées de trois parties distinctes, un domaine globulaire ATPase aux terminaisons N-ter et C-ter de la SMC, un long domaine hélicoïdal (« coiled-coil ») intramoléculaire et un domaine de dimérisation charnière. Le complexe est formé par un dimère SMC verrouillée par une kleisine (marron) associé à une seconde sous-unité non-SMC (orange).

a. Le domaine C-ter de MukF d'*E. coli* interagit avec la région 'cap' de la tête de MukB, tandis que la région centrale interagit avec un homodimère de MukE. En l'absence d'ATP, deux MukF et quatre MukE se lie à un dimère de MukB. La liaison de l'ATP déplace un MukF. Cependant, un dimère de dimères peut aussi se former via la dimérisation du domaine N-ter de MukF. **b.** Chez *Bacillus subtilis*, le domaine C-ter de la kleisine ScpA interagit avec la région de la coiffe d'une tête Smc, et le N-ter se lie à la région du "cou"

(interface entre le domaine enroulée et la tête globulaire) de l'autre monomère Smc. Un domaine central ScpA s'enroule autour d'un dimère de ScpB. La liaison ATP et l'engagement de la tête empêchent une seconde liaison ScpA. **c.** Le noyau des complexes SMC eucaryotes est composé d'un hétérodimère SMC, d'une kleisine et d'au moins une autre sous-unité non-SMC. En outre, plusieurs autres protéines accessoires sont nécessaires à l'action du complexe SMC. Le complexe de cohésine est illustré ici. Pour plus de clarté, un nuage orange représente les sous-unités non-SMC. Le domaine C-ter de la kleisine Scc1 interagit avec le domaine coiffe de Smc1, tandis que le domaine N-ter interagit avec le domaine tête de Smc3. Une interaction possible de 'cou' est montrée, comme dans *B. subtilis*. **d.** Le complexe Rad50-Mre11 est symétrique dans les formes liées et non liées à l'ATP. La protéine Rad50, semblable aux SMC, diffère des véritables protéines SMC par son domaine de dimérisation à doigts de zinc. Le domaine hélice-boucle-hélice C-ter de Mre11, représenté par un hexagone, se lie au cou de Rad50, tandis que le domaine central de "coiffage" interagit avec la tête. Le domaine de dimérisation N-ter porte des activités de liaison à l'ADN et de nucléase (jaune). **e.** RecN est une protéine de type SMC qui agit dans la réparation des CDB sans protéines accessoires connues et possède une courte portion hélicoïdale d'environ un quart de la longueur des autres protéines SMC. Figure empruntée à (Nolivos and Sherratt 2014).

Les condensines sont nécessaires lors de la mitose eucaryote, pour la réorganisation et compaction chromosomique (Hagstrom and Meyer 2003). Elles induisent une condensation générale des chromosomes. Chez les levures, elles sont déterminantes dans la formation du fuseau mitotiques. Thadani *et al.* ont révélé comment le renouvellement des condensines est régulé par leur activité d'ATPase et par la phosphorylation lors du cycle cellulaire (Thadani, Uhlmann, and Heeger 2012). Dans ce cas, l'ATPase contrôle la liaison du complexe au chromosome. L'ATPase de la condensine de la levure favorise la condensation des chromosomes. La phosphorylation de Smc4 par la kinase cycline-dépendante ajuste le renouvellement (Thadani et al. 2018).

Les cohésines sont considérées comme constituant de la « glue » entre chromatides sœurs. Elles permettent l'appariement des régions homologues. Chez les eucaryotes elle se structurent au moment de la réplication de l'ADN, afin que les chromatides sœurs restent proches avant de se séparer l'une de l'autre après alignement sur le fuseau mitotique. A cette étape de la mitose, les cohésines sont clivées pour permettre aux chromatides sœurs de se séparer dans les deux cellules filles. Les cohésines sont également essentielles à la méiose, et son emplacement chromosomique détermine clairement les événements de cohésion différentielle de la méiose I et II. Pendant la méiose I, au cours de laquelle les homologues s'apparient, la cohésine se localise tout le long des bras chromosomiques. Elle sont libérées le long des bras lorsque les homologues se séparent à la fin de la méiose I, mais reste aux centromères jusqu'à la fin de la méiose II pour maintenir les chromatides sœurs appariées jusqu'à leur ségrégation (Hagstrom and Meyer 2003). Certaines mutations entraînent une séparation précoce des chromatides sœurs, ou à l'inverse, empêchent leurs éliminations du chromosome, inhibant par conséquent la séparation des chromosomes frères.

En résumé, les SMC interagissent avec plusieurs autres protéines (appelées composants non-SMC) pour former différents complexes. Leurs fonctions vont de la condensation de la chromatine mitotique (complexe condensine), à la cohésion des chromatides sœurs (complexe cohésine), en passant par la réparation de l'ADN et la régulation des gènes (Hirano 2005; Nasmyth and Haering 2005).

Le modèle le plus récent expliquant le fonctionnement des SMC est appelé *loop extrusion*, panel b de la **Figure 34** (Alipour & Marko, 2012; Goloborodko *et al*, 2016). *In vitro*, la *loop extrusion* a été observé directement en test en molécule unique (Ganji *et al*, 2018). Les condensines bactériennes semblent pouvoir effectuer de la « *loop extrusion* » (Brandão *et al*, 2019; Wang *et al*, 2015). Il n'est pas encore connu si RecN peut l'effectuer. Représentations de différents modèles de capture de l'ADN par des SMC **Figure 34**.

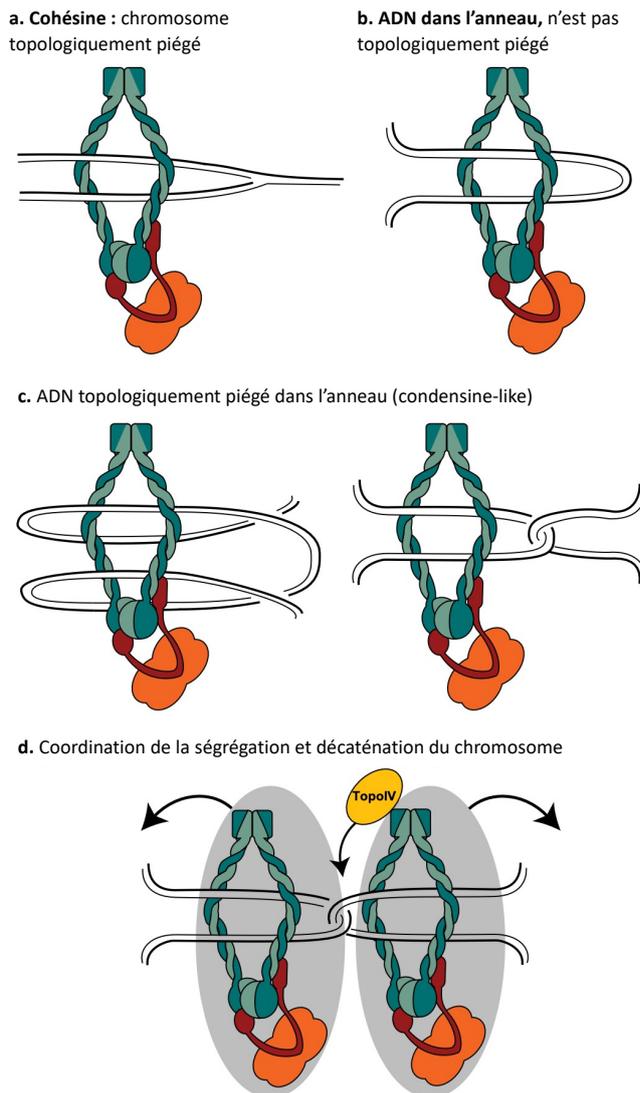


Figure 34 Modèle de capture de l'ADN par des SMC.

Modèle de cohésion. Les deux chromatides sœurs sont topologiquement piégés dans l'anneau de cohésine. La libération de la cohésion peut se produire après le clivage de la kleisine par la séparase. **(b et c)** Modèles de l'action des condensine et pour le positionnement des *oriC*. Deux segments d'ADN du même chromosome sont enfermés dans l'anneau et peuvent être topologiquement piégés **c.** ou non **b.** **d.** Un modèle de la façon dont la ségrégation bipolaire des *oriC* pourrait être coordonnée avec la décaténation des *oriC*. Un complexe MukBEF est lié à des régions sœurs qui sont caténées immédiatement après la réplication (un seul lien de caténation est représenté). Si le système de positionnement du foyer MukBEF proposé commence à se séparer pour générer deux clusters MukBEF, l'action de TopoIV (jaune ; associé aux clusters MukBEF) supprimera la tension des chromosomes frères et permettra leur séparation. Figure empruntée à (Nolivos and Sherratt 2014).

5.3 Les fonctions de RecN

RecN est indispensable pour reconfigurer l'architecture du nucléoïde à la suite de l'induction de la réponse SOS. Le rôle de ce remaniement spatial est encore mal compris. Étant donné son implication dans la réparation des CDB par RH, une part de la réponse pourrait être l'efficacité de la recherche d'homologie.

5.3.1 Réparation des cassures doubles brins

Pour évaluer la réparation des CDB, la sédimentation de l'ADN dans un gradient de sucrose a été utilisée. Dans la souche *recN*, la perte de capacité à réparer les CDB induite par les rayons-X a été estimée à 90% (Picksley, Morton, and Lloyd 1985). Pour les gènes *recF* et *recJ*, cette perte de capacité est évaluée à 70%, contre 30% pour *radA* et *uvrD*. Le rôle de RecN semble donc prépondérant.

Pour comprendre le rôle de RecN, des CDB inductibles (par une activité enzymatique) ont été réalisées avec I-SCEI. I-SCEI est une endonucléase inductible, qui coupe une séquence cible de 18 pb que l'on peut intégrer dans le génome. En absence de RecN, on constate que la survie bactérienne à quelques cassures I-SCEI est réduite drastiquement, équivalente à celle des mutants *recA* ou *recBCD*. Quand la CDB est réalisée à un seul locus, le mutant *recN* a un effet plutôt modeste, alors que RecA et RecBCD restent essentiels (Meddows et al. 2005). Cette différence suggère que RecN ne participe pas directement à la réaction de recombinaison nécessaire à la réparation (Sherratt 2003) mais pourrait aider ce processus par exemple en favorisant l'alignement des chromatides sœurs pour réaliser la RH. En accord avec cette idée, L'équipe d'Olivier Espéli a démontré que RecN empêche la ségrégation des chromatides sœurs endommagées et favorise la régression des chromosomes ségrégués (Vickridge *et al*, 2017). Deux phénomènes distincts peuvent se produire après un traitement à la MMC : soit une compaction globale de l'ADN, médiée par RecN et favorisant la rencontre aléatoire d'homologues, soit un réalignement des régions homologues. Pour distinguer ces deux hypothèses, Vickridge *et al* ont mesuré la distance entre deux loci marqués avec des protéines fluorescentes (une bleue et une jaune) espacés de 200 kb. Lorsque les cellules sauvages ont été traitées pendant 15 min avec de la MMC, les nucléoïdes bi-lobés ont

d'abord fusionnés puis les foci d'une couleur donnée se sont rapprochés d'autres foci de la même couleur jusqu'à fusionner. Par contraste la distance entre les foci bleus et jaunes les plus proches (ceux portés par la même chromatide sœur) n'a pas changé. Dans le mutant *recN* ces événements ne se produisent pas et les foci disparaissent progressivement sûrement à cause de la dégradation de l'ADN. RecN semble donc favoriser l'alignement des régions homologues mais pas la condensation d'une molécule d'ADN sur elle-même. RecN fonctionnerait comme une cohésine dédiée à la réparation de l'ADN. Étonnamment, une délétion de RecN peut être sauvée par une mutation thermosensible de la Topoisomérase IV, ce qui suggère que la fonction principale de RecN, est de maintenir les liens entre chromatides sœurs, comme le font les liens topologiques (précaténanes) lorsque la Topo IV est dysfonctionnelle (Vickridge et al. 2017).

Chez *B. subtilis* RecN_B fait approximativement 576 AA et 64 kDa. *In vivo* RecN_B s'accumule aux CDB dans les 15 à 30 min suivant l'induction des dommages (Mascarenhas et al. 2006). *In vitro* elle se lie préférentiellement à de l'ADNsb, bien qu'elle puisse aussi sur de l'ADNdb (Graumann and Knust 2009). Sur de l'ADNsb elle semble pouvoir s'attacher sur de longues portions *in vitro* (Sanchez and Alonso 2005). Cette activité n'a pas été observée avec les protéines RecN purifiées de *Haemophilus influenzae*, *Aquifex aeolicus*, et *Bacteriodes fragilis*. *In vitro* elle peut également se lier à de l'ADNdb (Graumann and Knust 2009). Une étude récente a conclu que RecA est requise pour l'assemblage de RecN en complexe de réparation sur le nucléoïde avec des cellules en croissance et en réponse aux CDB. En absence de la fonction RecA, les foyers de RecN_B se forment dans un faible pourcentage de cellules, RecN_B se localise loin du nucléoïde, et RecN_B ne parvient pas à s'assembler en réponse aux dommages de l'ADN. En revanche, ils montrent que la réponse des foyers RecA-GFP aux dommages de l'ADN est inchangée en présence ou en absence de RecN_B (Reyes et al. 2010; McLean, Lenhart, and Simmons 2021). De plus, l'absence de *addAB* (*recBCD* de *B. subtilis*) entraîne l'incapacité de RecN_B à former des foyers.

La visualisation de la réparation des cassures double brin de l'ADN dans des bactéries vivantes révèle également le recrutement dynamique des protéines RecF, RecO et RecN_B de sites précis sur les nucléoïdes. RecN est le premier à arriver au foyer, puis RecO, suivie par RecF. Ainsi, l'idée d'un centre de réparation prend forme. RecF n'a pas formé de foyers

en absence de *recN* ou de *recO*, démontrant un rôle central de RecN et de RecO dans l'initialisation de la formation des centres de réparation (Kidane et al. 2004).

Cette notion de centre de réparation émerge aussi chez *E. coli*, en cherchant à répondre à la question : comment RecN est recrutée sur le chromosome, l'équipe de Keyamura a annoncé, grâce à des techniques de microscopie, que RecA pouvait recruter RecN_GFP au site de CDB. Ils montrent que ce recrutement nécessite le résidu RecAQ300 suggérant que l'interaction entre RecN et RecA fait intervenir RecAQ300 (Keyamura et al. 2013). Cependant ce modèle a été partiellement invalidé en 2020 par (Klimova and Sandler 2020) qui ont montré que le mutant *recAQ300R* et la délétion de *recN* étaient dans deux voies épistatiques différentes. L'interaction entre RecN_E et RecA a toutefois pu être confirmée par des expériences de co-immunoprécipitation dans des souches exprimant RecN-Flag en présence de MMC. De plus, l'absence de RecN_E modifie la dynamique de RecA sur l'ADN avec une modification du type de foyer et de leurs dynamiques (Vickridge et al. 2017).

RecA et une interaction entre RecN et RecA semblent donc nécessaires au chargement de RecN sur l'ADN. Mais il convient de souligner que ces données n'apprennent rien sur la manière dont RecA et RecN interagissent physiquement. Laissant donc sans réponse la question : Comment RecN est-elle recrutée sur le chromosome ?

5.3.2 Maintien des extrémités d'ADN fragmentées

Chez *Deinococcus radiodurans* (*D. radiodurans*) une bactérie extrémophile capable de tolérer des centaines de CDB à son génome, et *B. subtilis*, l'expression de RecN ne dépend pas de la réponse SOS. En effet, l'orthologue de *B. subtilis* est exprimé de manière constitutive, quant aux transcrits de RecN de *D. radiodurans* (que nous appellerons RecN_D) ne changent pas en réponse aux dommages de l'ADN. Ceci suggère que RecN_D joue un rôle systémique dans la maintenance du génome. Il a été démontré *in vitro*, que RecN_D pouvait stimuler la ligation intermoléculaire d'ADNdb linéaire en présence de ligases. L'activité ATPase de RecN_D est stimulée par l'ADNdb. Cela suggère qu'*in vivo*, RecN pourrait s'associer aux extrémités d'ADN aux bouts francs, et aider ainsi au maintien de l'intégrité du chromosome en cas de CDB (Reyes et al. 2010). L'analyse structurel réalisée par l'équipe de Pellegrino, avait permis de proposer un modèle (**Figure 35**) de RecN_D où elle pouvait s'attacher aux

extrémités de l'ADN, polymériser le long de l'ADNdb endommagé et encercler les deux molécules d'ADN (Pellegrino et al. 2012).

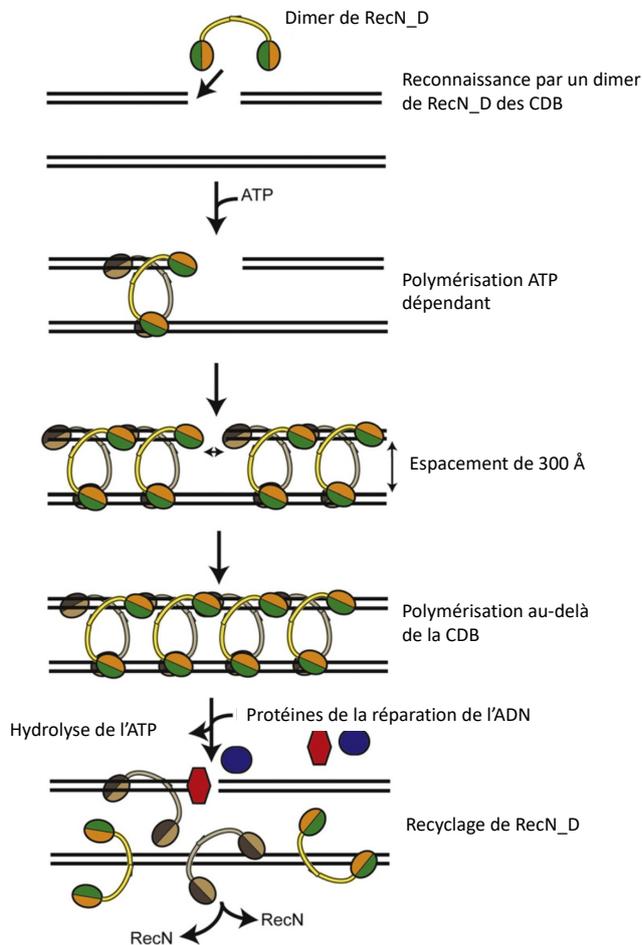


Figure 35 Modèle préliminaire de la prise en charge des CDB par RecN_D

Les CDB sont reconnues par RecN sous la forme d'un dimère ouvert. La reconnaissance et la liaison à l'ADN se font par l'intermédiaire de la tête. L'assemblage sur l'ADN est favorisé par la liaison à l'ADN et l'engagement tête-tête, conduisant ainsi à la formation d'un tétramère et par la suite, RecN_D se polymérise en un filament hélicoïdal qui s'enroule autour de l'ADN endommagé et de la chromatide sœur (la séparation spatiale entre les deux brins homologues pourrait correspondre à 300 Å). L'engagement tête-bêche de deux RecN_D de part et d'autre de la CDB permettrait de maintenir les extrémités de l'ADN proches et de les rendre disponibles pour la RH. L'arrivée de la machinerie de réparation peut stimuler l'hydrolyse de l'ATP, ce qui conduirait au désengagement des domaines de la tête et au désassemblage du filament de RecN_D. RecN libérée serait alors disponible pour un nouveau cycle. Figure adaptée de (Pellegrino et al. 2012)

5.3.3 Stabilisation des D-loop

Dans le cadre d'une CDB, il peut également y avoir la nécessité de réinitialiser la réplication par le phénomène de D-loop. Les D-loop sont des triplex d'ADN formant la recherche d'homologie, pouvant également conduire, si elle est stabilisée, à une origine de réplication éphémère (Asai and Kogoma 1994).

L'équipe de Hishida a étudié l'association de RecN_E à de l'ADN. Ils ont fixé sur RecN_E sur des billes, puis ajouter différents substrats d'ADN (ADNsb linéaire ou circulaire, ADNdb linéaire ou circulaire), puis évalué par EMSA si RecN s'était attaché à l'ADN. L'ADN linéaire double brin n'a pas été observé associé à RecN. En revanche, ils ont pu constater son accumulation sur de l'ADNsb et ADNdb circulaire, avec une préférence pour de l'ADNsb. Le fait qu'on ne la retrouve pas sur de l'ADN linéaire double brin semble indiquer que RecN « glisse » sur l'ADN, tout en y restant attachée comme une perle d'un collier de perle. L'ATP permet d'augmenter l'attachement à un second brin d'ADNdb (Keyamura and Hishida 2019). Par ailleurs, cette étude a montré que RecA limite la « dissociation » de RecN-ADNsb linéaire. Ceci peut être due à deux phénomènes : soit une interaction directe entre RecN et RecA qui retient RecN, soit à un blocage spatial. La dernière conclusion de l'article montre que RecN peut stimuler et stabiliser la formation de D-Loop, quand RecA réalise l'invasion de branche (Keyamura and Hishida 2019).

6 RecN est dégradé par le protéasome ClpXP

La dégradation protéique est un processus essentiel chez toutes les cellules vivantes. Ce processus sert à éliminer les protéines endommagées, mal repliées et à la modulation des voies de régulation en contrôlant la concentration de protéines produites ou de protéines régulatrices. Chez les bactéries, la dégradation ciblée des protéines est effectuée par la famille des protéases AAA+, regroupant ClpAP, ClpXP, FtsH, HslUV (également appelé ClpYQ), ou Lon. ClpXP est une protéase cytoplasmique qui joue un rôle important dans beaucoup de processus cellulaires incluant la régulation de la réponse SOS, et du contrôle qualité de protéines (Ades 2004).

6.1 La protéase ClpXP régule la quantité de RecN ainsi que d'autres protéines du SOS

L'histoire de ClpXP est intimement liée à celle de ClpAP, une protéase AAA+ qui a été purifiée à la fin des années 1980 (Katayama-Fujimura, Gottesman, and Maurizi 1987). Les protéines aux domaines AAA+ contiennent des structures de liaisons à l'ATP conservées avec des domaines en N-terminal α/β et en C-terminal α -hélicoïdal. Les domaines AAA+ sont

rattachés à une diversité d'autres domaines, qui dans certains cas, interagissent avec des adaptateurs protéiques afin de générer une diversité de structure et de fonction. Les gènes orthologues de *clpP* sont répandus chez les *eubacteries*, chez les mitochondries et les chloroplastes.

ClpP est une protéase à sérine avec une activité de type chymotrypsine que l'on peut retrouver dans les peptidases digestives sécrétées par le pancréas. Par conséquent, elle est capable de rompre les liaisons peptidiques par hydrolyse. Elle peut également former différents complexes tel que ClpAP, ClpAPX, et ClpXP. Ces différents complexes ont une affinité de substrats différents. ClpP seule est uniquement capable de dégrader de petits peptides, mais elle n'a pas d'activité significative contre les protéines entières qui doivent être déployées (Neher et al. 2006). Pour pouvoir dégrader des protéines les sous unités ClpA ou ClpX, des « unfoldase » sont requises (Baker and Sauer 2012).

6.1.1 La fonction de ClpXP

ClpX a pour fonction de reconnaître le substrat protéique, de le déployer, et de le transmettre par translocation polypeptidique jusqu'à la portion peptidase de ClpP. Elle peut cibler sélectivement différents substrats. La reconnaissance est permise grâce à des motifs peptidiques de courte séquence en AA appeler « tag ». Ce Tag peut être constitutif de la protéine ou être ajouté. Cinq classes de tags ont été déterminées. Une illustration en cartoon est proposée **Figure 36**. Une fois le substrat attrapé, la translocation peut se faire soit par le C-ter ou en N-ter (Reid et al. 2001). Ces étapes de déploiement et de translocation sont dépendantes de changement de conformation structurelle du complexe et requiert l'hydrolyse de l'ATP.

ClpP peut cliver des substrats à un taux de ~10 000 AA / min (Baker and Sauer 2012). ClpP participe à la désintégration physiologique de corps d'inclusion bactérien (Vera et al. 2005). Elle appartient plus spécifiquement à la famille des protéases auto-compartmentées qui fait partie du protéasome. Elle est entre autres requise pour l'adaptation d'*E. coli* à une longue période de phase stationnaire (Weichart et al. 2003).

ClpXP dégrade les protéines qui contiennent le tag *ssrA* en C-ter chez *E. coli* (Gottesman et al. 1998). Le tag *ssrA* est utilisée par la cellule pour adresser la protéine au système de dégradation. Le mode de fonctionnement de ClpXP est détaillé **Figure 36**.

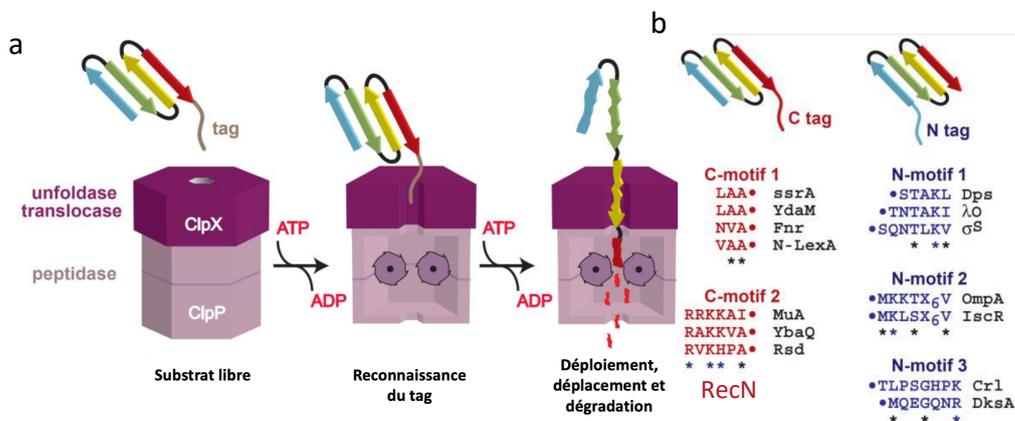


Figure 36 Modèle en cartoon de ClpXP et les motifs peptidiques reconnus

a. Modèle en cartoon de la reconnaissance et de la dégradation du substrat par la protéase ClpXP. La reconnaissance se fait par un « tag » peptidique au sein de la protéine. Le substrat protéique se fixe dans le pore axial de l'hexamère ClpX. ClpX déploie le substrat et transfère le polypeptide déplié dans la chambre de dégradation de ClpP, où il est clivé en petits fragments peptidiques (protéolyse dépendante de l'ATP). b. Les 5 classes de tags pouvant être reconnues par ClpXP sont soit en C-ter ou N-ter de la protéine cible. Adapté de (Baker and Sauer 2012).

Deux protéines permettent la reconnaissance des substrats SspB et RssB. SspB (pour « stringent starvation protein »), est un adaptateur protéique qui peut également s'associer à ClpX. L'interaction entre SspB, le tag *ssrA* et la protéine ClpX, améliore la reconnaissance du substrat, et accroît le taux de dégradation (Shi et al. 2018). RssB est un régulateur de réponse à deux composants qui contrôle la dégradation de σ^S , le facteur de transcription de la phase stationnaire d'*E. coli* (Baker and Sauer 2012).

6.1.2 ClpXP cible RecN et d'autres protéines de la réponses SOS.

RecN contient le tag de dégradation *ssrA* en C-ter (Nagashima et al. 2006), ce qui lui permet d'être rapidement dégradée par ClpXP (Warr et al. 2019). D'autres protéines du SOS comme UvrA sont aussi la cible de ClpXP (Neher et al. 2006). Les protéines du SOS seraient globalement très instables avec un temps de demi-vie inférieure à 10 min pour YebG, UmuC, RecN, Sula, et inférieure à 20 min pour UmuD, DinD, RecA. La capacité de ClpXP à dégrader les protéines n'est pas modulée par le simple influx de nouveaux substrats, mais elle est

activement régulée. Ce phénomène est bien caractérisé pour Dps. Dps est dégradée par ClpXP pendant la croissance exponentielle mais stabilisée lorsque les cellules entrent en phase stationnaire ou subissent des stress génotoxiques. L'hypothèse avancée serait que l'interaction avec l'ADN polymérase pendant l'induction de la réponse SOS, pourrait protéger Dps de la dégradation (Stephani *et al*, 2003; Sen *et al*, 2020).

Le temps de demi-vie de RecN évalué *in vivo* à 37°C par Western Blot, est de 8-10 min après une induction à la MMC de 0,5 µg/ml (Nagashima *et al*. 2006). Pour que la concentration cellulaire de RecN augmente de façon significative et se maintienne durant la réponse SOS, *recN* est fortement transcrit puis traduit (Neher *et al*. 2006). Chez les mutants *clpX*, à la suite de l'induction de la réponse SOS, RecN persiste dans le cytoplasme et s'agrègent aux pôles, ou forme des corps d'inclusions. La persistance de la protéine finit par être toxique. La dégradation de RecN est importante pour la viabilité cellulaire (Nagashima *et al*. 2006). ClpXP sert au retour de la reprise du cycle cellulaire. En effet, une fois les dommages réparés, l'expression des gènes de la réponse SOS cesse, ClpXP dégrade, entre autres, RecN, et le cycle peut reprendre. La dégradation de RecN est essentielle pour la ségrégation des chromosomes et la division cellulaires des cellules exprimant RecN constitutivement (Warr *et al*. 2019). Ce besoin de dégrader RecN explique à lui seul la létalité du mutant *lexA51 clpP* (**Figure 37**).

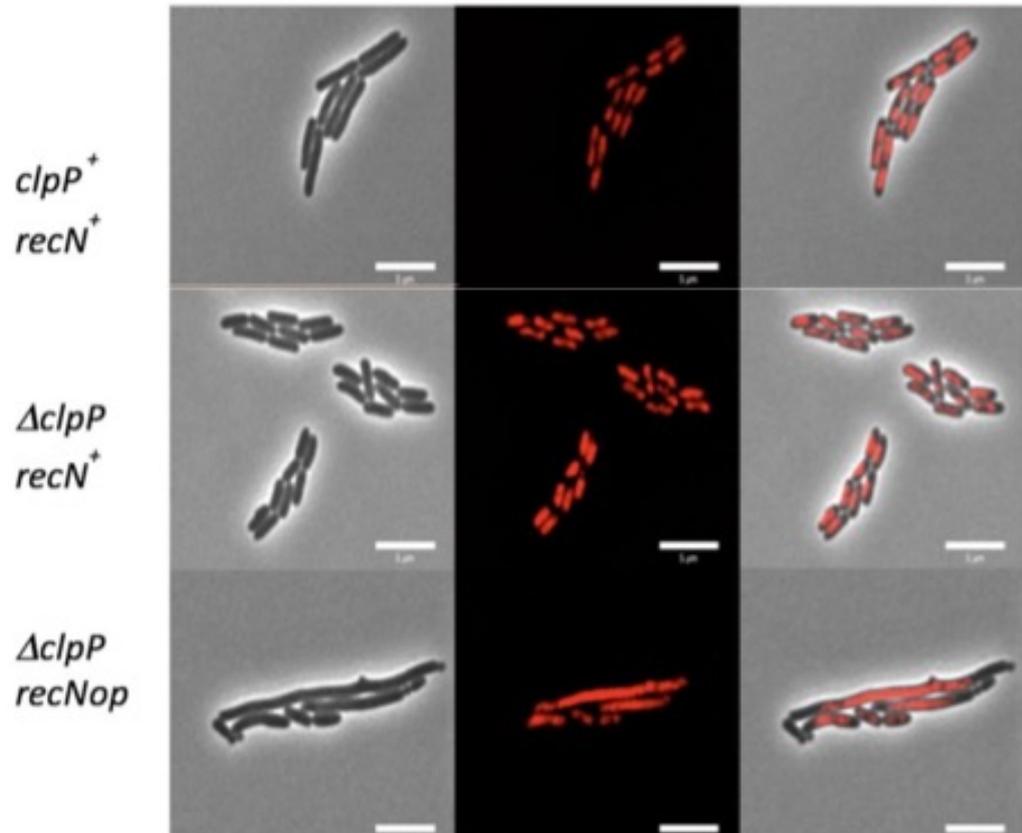


Figure 37 Phénotype de la division déficiente chez les mutants $\Delta clpP$

Chaque souche contient une protéine de fusion hupA-mCherry qui permet la visualisation directe des nucléoïdes. Les trois colonnes montrent : colonne de gauche l'image en contraste de phase, colonne du milieu l'image des nucléoïdes en rouges et colonne de droite l'image fusionnée. Pour chaque ligne correspond une souche et son génotype. Seul le double mutant ($\Delta clpP$ $recNop$) présente des cellules en filamentation, des mini cellules et des excroissances avec un nucléoïde diffus. Figure empruntée à (Warr et al. 2019).

ClpXP joue un autre rôle dans la reprise du cycle cellulaire après un stress génotoxique. Il a été découvert que ClpXP peut aider à réguler l'assemblage de l'anneau-Z en dégradant FtsZ et notamment les formes de FtsZ désassemblées par SulA (Weart et al. 2005; Camberg, Hoskins, and Wickner 2009) **Figure 38**.

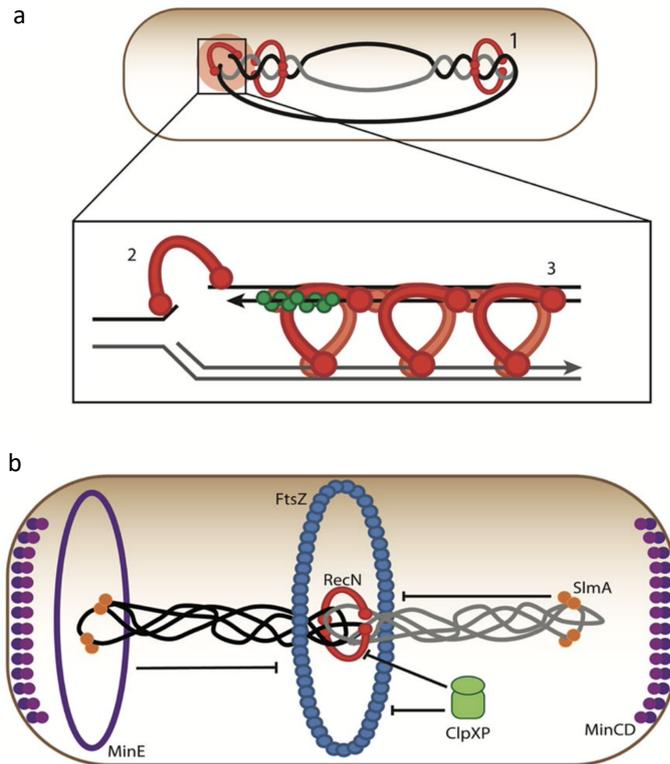


Figure 38 Modèle des relations entre RecN, ClpXP et la reprise du cycle cellulaire

a. La réplication bidirectionnelle ce qui conduit à la formation de pré-caténanes, ou brins filles entrelacés. En l'absence de dommages à l'ADN, les brins filles sont séparés par la Topoisomérase IV, permettant la ségrégation des chromatides sœurs. A la suite de la réponse SOS, RecN pourrait agir pour maintenir ces précaténanes ensemble, empêchant la ségrégation. Cela permet de maintenir les chromatides sœurs proches, facilitant ainsi la réparation des dommages à l'ADN guidée par le modèle (Vickridge et al., 2017). (2) On suppose que RecN remplit une fonction de jonction des extrémités pendant la réparation des cassures double brin (Meddows et al., 2005 ; Grove et al., 2009). RecN peut interagir avec RecA pour faciliter la recherche d'homologie et l'invasion des brins

pendant la recombinaison homologue des cassures double-brin (Uranga et al., 2017). RecN est représentée comme un cercle ouvert ou une structure hélicoïdale. **b.** Avant la division cellulaire, l'anneau Z se forme par polymérisation de la protéine FtsZ. Cette polymérisation est dynamique et modulée par plusieurs protéines. Le système oscillant Min empêche l'assemblage de l'anneau Z aux pôles via l'action de MinC. Le système d'occlusion du nucléoïde empêche la formation prématurée de l'anneau Z sur le nucléoïde avant la fin de la réplication de l'ADN via la protéine SlmA. La protéase ClpXP module directement l'assemblage des polymères FtsZ. RecN est connue pour son rôle dans la réparation des CDB. Au début de la réponse SOS, elle agit comme une protéine de type cohésine pour maintenir chromatides sœurs. Cela pourrait accélérer la réparation par recombinaison homologue. Pour s'assurer que la division cellulaire ne progresse pas avant que les dommages ne soient réparés, il est possible que des niveaux élevés de RecN inhibent la division cellulaire. Cette fonction est modérée par la dégradation par ClpXP. Figure empruntée à (Warr et al. 2019).

VI. Objectifs de la thèse

L'objectif général de mon travail de doctorat a été d'étudier les liens entre la cohésion des chromatides sœurs et la réparation de l'ADN impliquant RecN. Mes recherches portaient initialement sur les mécanismes permettant à RecN d'influencer sur la dynamique des chromatides sœurs et le remodelage du nucléoïde mais elles ont rapidement évolué vers l'étude de la réponse globale aux stress génotoxiques et aux rôles qu'y jouent RecN et ses partenaires. Il apparaît de ce travail que la compréhension des fonctions d'une protéine du SOS ne peut s'inscrire que dans la compréhension du contexte global de son fonctionnement, ce que l'on peut appeler la Réponse au Stress Génotoxique ou (GSR) (Hanawalt, 2015).

La réponse SOS implique beaucoup d'acteurs dont 1/6 ont des fonctions totalement inconnues. Il existe des systèmes de réparations spécialisés selon le type de lésion. Au sein de la réponse SOS je me suis focalisé sur une protéine intervenant dans l'efficacité de la recombinaison homologue : la protéine RecN.

Par sa structure et sa fonction, RecN fait partie de la famille des SMC. Les SMC sont présentes dans tous les règnes du vivant. Elles interviennent sur le chromosome à différents niveaux : la condensation, la ségrégation, la cohésion des chromatides sœurs et la réparation de l'ADN par recombinaison. A l'origine de mon travail de thèse il y a le travail réalisé par une ancienne doctorante, qui a démontré que RecN favorisait le rapprochement des chromatides sœurs. Plusieurs questions émergeaient au début de ma thèse : quels sont les mécanismes qui permettent cette fonction ? Est-ce que ce processus est responsable de la très grande capacité de survie des *E. coli* exprimant RecN en MMC ? A la lumière d'expériences préliminaires, la voie de réparation du Nucleotide Excision Repair (NER) pourraient prendre part à l'action de RecN. De ce fait, mon étude ne s'est pas limitée à la protéine RecN, mais s'est élargie aux interconnexions possibles entre RecN et d'autres voies de réparation, dont des protéines du NER : UvrABC. Ainsi qu'à d'autres aspects métaboliques intervenant dans la survie.

Plusieurs axes ont été explorés :

L'aspect cohésion : Qu'est-ce qui permet à RecN de favoriser la cohésion des chromatides sœurs ? Comment ce phénomène est-il capable de réorganiser l'architecture spatiale du

nucléoïde tout entier, tout en étant permissif pour la reprise de la ségrégation des chromosomes ? Quel est la dynamique des chromatides sœurs imputable à RecN ?

L'aspect des partenaires : En tant que « SMC like », qu'elles sont ses partenaires potentiels qui interviennent dans l'exécution et la régulation de ce système ? Les cohésines ont souvent des partenaires pour moduler leur fonctionnement et prémunir la cellule d'impact délétère.

Plusieurs axes ont servi à structurer mon travail de thèse :

1. Identifier des partenaires de RecN.
2. Déterminer le rôle de RecN dans le processus global de réparation.
3. Caractérisé l'action de RecN sur la cohésion des chromatides sœurs.

Afin de répondre à ces questions, je me suis servi de plusieurs outils.

Deux agents génotoxiques, la MMC et la BLM, tous deux permettant de générer des cassures doubles brins mais aussi d'autres lésions. Bien que générant tous deux des CDB, la nature du type de lésions est différente. L'utilisation de la BLM a permis d'ouvrir de nouvelles pistes de recherche pour comprendre avec une plus grande précision comment les différents systèmes s'articulent et quels sont les partenaires de RecN permettant de survivre à chaque agent génotoxique lors de la réponse (globale) au stress génotoxique.

Pour identifier des voies connexes associées et des partenaires potentiels à RecN, j'ai effectué un criblage par mutagenèse transposon, suivi d'une analyse de séquençage appelée Tn-Seq ou TIS. Le TIS est une technique puissante qui nous permet d'identifier tous les gènes requis pour la survie, dans différentes conditions et pour différents mutants. De cette manière elle peut être assimilée à une analyse épistatique à l'échelle du génome entier.

Pour évaluer la dynamique de cohésion des chromatides sœurs sur l'ensemble du génome à la suite d'un stress génotoxique, sur une population en croissance, j'ai adapté la technique de HiSC-2 (Espinosa *et al*, 2020) à *E. coli*. En complément de cette technique, nous avons réalisé par microscopie l'observation du nucléoïde, j'ai montré une dissociation de fonction entre cohésion des chromatides sœurs et compaction du nucléoïde.

J'ai pu déterminer que selon la lésion, BLM ou MMC, les gènes HR impliqués dans la réparation diffèrent mais que RecN est l'un des seuls éléments communs. RecN, UvrA, ClpXP, XthA, RecFOR sont des partenaires fonctionnels. RecN est à l'origine de connexions entre les voies du NER où du BER et la recombinaison homologue. Plus particulièrement, j'ai démontré que la quantité de RecN et son activité de cohésion des chromatides sœurs sont dépendantes du bon fonctionnement du NER en présence de MMC. Cela suggère que la protéolyse est impliquée dans le processus de réparation. Et d'autres partenaires potentiels ont été mis en lumière. Finalement, mon travail met en lumière le fait que la GSR n'implique pas que les gènes DDR mais également de nombreuses fonctions comme les pompes à efflux et leur mise en place par le complexe BAM, des régulateurs du cycle cellulaire, des effecteurs de la réponse aux stress oxydant, le métabolisme respiratoire et même des éléments extracellulaires. La présence ou l'absence de RecN va déplacer les équilibres entre ces différentes voies de réparation ou de tolérance des lésions.

Les travaux obtenus au cours de ma thèse sont présentés dans la section « Résultats » et inclus sous forme :

- ♣ d'un article, actuellement en soumission, intitulé " The SMC like protein RecN is at the crossroads of Genotoxic Stress Responses in *Escherchia coli* ".

VII. Article

1 Article

The SMC like protein RecN is at the crossroads of Genotoxic Stress Responses in *Escherchia coli*

Adrien Camus¹, Elena Alfaro Espinosa², Penelope Zapater Baras¹, Nicole Quenech'Du¹, Elise Vickridge^{1,3}, Mauro Modesti⁴, François Xavier Barre² and Olivier Espéli^{1*}

¹ CIRB, College de France, INSERM U1050, CNRS UMR7241, Université PSL, Paris France

² Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Université Paris-Saclay, CEA, CNRS Gif sur Yvette, France

³ McGill University, Montreal, Canada

⁴ CRCM, Marseille

* For correspondence olivier.espeli@college-de-france.fr

1.1 Abstract :

DNA damage repair (DDR) is an essential process for living organisms, it contributes to genome maintenance and evolution. DDR involves different pathways including Homologous recombination (HR), Nucleotide Excision Repair (NER) and Base excision repair (BER) for example. The activity of each pathway is revealed in particular contexts, but they also intervene concomitantly or subsequently to repair most DNA lesions. In the present study, we used two genotoxic antibiotics, mitomycin C (MMC) and Bleomycin (BLM), to decipher the interplays between these different pathways in *E. coli*. We demonstrated that only a small set of DDR proteins are common to the repair of the lesions induced by these two drugs. Among them, RecN, an SMC like protein, plays an important role by controlling sister chromatids dynamics and genome morphology at different steps of the repair processes. We demonstrated that RecN's influence on sister chromatids dynamics is not equivalent during the processing of the lesions induced by the two drugs. We observed that RecN activity and stability requires NER pre-processing of lesions when they are induced by MMC but not when induced by BLM. In addition to its well-known importance to save cells presenting double strand breaks by engaging them in the HR pathway, our results show that RecN plays a major role in rescuing toxic intermediates generated by the BER pathway.

1.2 Introduction

Molecular processes that maintain genomic integrity are essential for all organisms. This is necessary because DNA damage from internal or external sources can arise during every round of genome duplication. Pioneer works and recent textbooks tend to attribute a particular DNA damage response (DDR) to each type of lesions (Molecular Biology of the Cell). Omics data, however, showed that genomic alterations and their processing involve broader cellular responses (Derks *et al*, 2014). The Genomic Stress Response (GSR) provides a window of opportunity for DNA repair before cells enter into deadly pathways; it includes adaptation of the cellular metabolism (Mendoza-Chamizo *et al*, 2018), cell cycle control, lesion repair and lesion tolerance (Hanawalt, 2015). The various repair pathways sometimes compete with each other to process the same lesion. In this multistep repair pathway, each step creates an intermediate that constitutes another lesion which may recruit another repair pathway. In bacteria, DDR involves error free mechanisms: Photoreactivation, Base Excision Repair (BER), Nucleotide Excision Repair (NER) and Homologous Recombination (HR); and error prone mechanisms: Non Homologous End Joining (NHEJ) and Translesion Synthesis (TLS). During replication, many DNA alterations, including alkylation, oxidation, cyclobutane pyrimidine dimers, adduct, Interstrand Cross Links, frozen enzymes, repair intermediates or arrested replication forks) may lead to DNA strand breaks either Single Strand (SS) gaps or Double Strand Breaks (DSB). DSB are the most deleterious types of DNA damage; in *E. coli*, they induce the SOS response (Radman 1975) that will allow the massive production of proteins involved in HR, NER and TLS in every strains and eventually NHEJ in strains that encode it (Bhattacharyya *et al*, 2018).

Bacteria frequently produce and secrete antibiotics with genotoxic properties to preserve their niche. These antibiotics have been used for clinical application to treat infections or cancers (Matic, 2018). In the present work, we analyzed the GSR induced by two genotoxic antibiotics: Bleomycin and Mitomycin C. Bleomycin (BLM) is a glycopeptide antibiotic and anti-tumor agent isolated from *Streptomyces verticillus*, which targets primarily the furanose rings of DNA. In the presence of required cofactors (Fe^{2+} and O_2), BLM directly causes both single-stranded (ss) and double-stranded (ds) DNA damage. DNA degradation by BLM is initiated by generating a free radical, in the deoxyribose. At low oxygen tension, oxidized abasic (AP) sites are favored while at high oxygen tension single- and double-strand breaks (DSBs) predominate (Burger *et al*, 1981). These alternative pathways lead to a mix of abasic sites and single strand or double strand breaks which occur at a 3:1 ratio (Steighner & Povirk, 1990)(Chen *et al*, 2008). The DSBs are suspected to be the major cause of cell death. MMC is a prodrug that requires activation to exert its DNA toxicity. This process catalyzes conversion of mitomycin to mitomycin hydroquinone with subsequent formation of indolohydroquinone. This latter form interacts with DNA, forming the cross-linked DNA mitomycin-DNA adducts. Pioneer works showed that the impact of MMC is dose dependent; at low concentration (less than 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), the action of the antibiotic was bacteriostatic. Cell elongation and nucleoid compaction resulted (Lossius *et al*, 1983), but no effect on the

synthesis of cellular macromolecules was apparent, at higher levels, MMC was highly bactericidal and inhibited deoxyribonucleic acid synthesis almost completely (Suzuki & Kilgore, 1967).

Even though MMC and BLM alter DNA in different ways, earlier studies revealed that HR is essential for survival to both agents (Kosa *et al*, 2004)(Cupido and Bridges 1985); Kushner, 1974; Keller *et al*, 2001). In addition, induction of the production of RecN by the SOS regulon, appeared to play important roles for the processing and repair of DNA lesions generated by MMC (Picksley *et al*, 1984) and BLM (Kosa *et al*, 2004; Xu *et al*, 2012). However, the function of RecN in these two repair processes is not yet understood. RecN is a SMC-like protein (Pellegrino, Radzimanowski *et al*. 2012) that binds on single stand DNA where it can catch a second DNA molecule (Meddows *et al*. 2005; Nagashima *et al*. 2006; Keyamura *et al*. 2013; Keyamura and Hishida 2019). *In vitro*, RecN stimulates the ligation of DNA molecules (Reyes *et al*. 2010). *In vivo*, RecN halts sister chromatid segregation and promotes nucleoid compaction (Vickridge *et al*. 2017). Overexpression of RecN is toxic for the cell (Warr *et al*, 2019) and its level regulated by the ClpXP proteasome (Nagashima *et al*. 2006; Neher *et al*. 2006; Warr *et al*. 2019). Because RecN interacts with RecA (Vickridge *et al*, 2017) and both are equivalently required to survive I-SCE 1 mediated DSB, they are generally associated in the same epistatic group (Meddows *et al*. 2005). Recent data, however suggests that RecA and RecN may also function in genetically distinct pathways important for DNA repair (Klimova & Sandler, 2020).

In the present study, we took advantage of its involvement in the repair of two different lesions to investigate the different roles of RecN in GSR. We demonstrated that sister chromatid dynamics and nucleoid management by RecN differ according to the drug considered. RecN requires pre-processing of MMC-induced lesions by the NER. Nevertheless, the activity of RecN on sister chromatids is manifested early in the repair process. In contrast, RecN does not require NER processing when the lesions are induced by BLM. In addition, the activity of RecN on sister chromatids is delayed to the recovery phase. TIS analysis revealed that RecN is one of the rare DDR genes involved in the GSR of both drugs. RecN absence significantly perturbed GSR, notably by increasing the pressure on the BER pathway while concomitantly reducing the importance of homologous recombination. The TIS analysis also highlighted the importance of drug tolerance pathways such as efflux systems, oxidative stress management and cell cycle controllers for successful recovery from DNA alterations and how RecN activity moves the equilibrium between different solutions. More generally, this work illustrates that GSR is an integrated processes that cells deploy to create the conditions for their survival.

1.3 Results

Sister chromatid dynamics in normal and pathological conditions

Using a genetic tool developed in the lab (Lesterlin *et al*, 2012), we observed that RecN maintains a high level of sister chromatid interactions (SCI) in presence of MMC (Vickridge *et al*, 2017). Recently, an adaptation of this tool, Hi-SC2, was developed to survey sister chromatid interactions at the genome level (Espinosa *et al*, 2020). We have seized this opportunity to question SC dynamics at the whole genome level in the presence of MMC and BLM. To find adequate conditions for Hi-SC2, we performed viability assays in the presence of the drugs (**Figure_ 1 A**). We observed that treatments for 20 min at a concentration of 5 μ M of MMC or 0.5 μ g/ml of BLM were well tolerated by the WT cells, not tolerated by the *recA* mutant, and modestly affected the survival of the *recN* mutant. We controlled that these treatments induced SOS in the WT and *recN* strains (**Figure_ 1 B**) and did not affect expression of the ParaBAD promoter that is required to induce Cre recombinase expression in the Hi-SC2 experiments. We used a smoothing with a sliding window of 50 kb to plot Hi-SC2 recombination frequency according to genome coordinates (**Figure_ 1 C**). In the absence of drugs we observed a monotonous recombination frequency (RF) profile with domes (\approx 500 kb) of higher recombination frequency (RF \approx 20%) separated by valleys (RF \approx 10%). The WT and *recN* profiles were very similar (P= xx). Overall, the recombination frequency was slightly higher in the terminus domain than near *oriC*. These observations agree with previous analysis in *E. coli* of single loci (Lesterlin *et al*, 2012), but contrast with previous reports in *V. cholerae* where the origin and the terminus show peaks of recombination (Espinosa *et al*, 2020). In the WT strain, we observed that MMC treatment provoked a general decrease (50% reduction) of inter sister chromatid LoxP/Cre recombination and presumably of SCC. In the absence of RecN this reduction was dramatic and almost no recombination was observed in the conditions of the assay (**Figure_ 1 C**). In the presence of BLM, Sister Chromatids Cohesion (SCC) increased to a high-level 20 min after treatment in the presence and absence of RecN (**Figure_ 1 C**). SCC dynamics, therefore, adapt to the type of lesions and the genetic background.

RecN determines SCC in the recovery phase

The lack of effect of the *recN* deletion on SCC in the presence of BLM was surprising. For a deeper investigation of this phenomenon, we performed Hi-SC2 experiments during the recovery phase when cells were washed from MMC or BLM (**Figure_ 1 D**). Seventy minutes after MMC wash, a normal level of SCC was recovered in the WT cells and only a partial recovery was observed in the *recN* mutant. In the presence of BLM, we observed a very high recombination frequency (RF \approx 60%) in the WT strain. In the *recN* strain, by contrast, we observed an abrupt decline (RF < 10%) compared to the treatment period (RF \approx 25%). We did not observe changes in the replication profile of these cells that could explain such differences (**Supplementary Figure 1**). Hi-SC2 analysis confirmed that RecN is required to maintain SCC in the immediate moments following MMC treatment; however, during the recovery phase of MMC-induced damage, RecN did not appear essential to restore SCC. We also revealed that RecN does not play a major role during the initial BLM-induced damages' phase. However, RecN is required during the recovery phase of BLM-induced damages.

Alteration of nucleoid morphology correlates with SCC profiles

In response to various stresses the bacterial nucleoid compacts transiently in a RecN dependent manner (Odsbu & Skarstad, 2014; Vickridge *et al*, 2017; Keyamura *et al*, 2013). Using fluorescence imaging, we questioned whether SCC correlate with nucleoid compaction. We observed cell morphology and nucleoid shape in a time course experiment corresponding to a 20 min treatment followed by 6 hours of recovery (**Figure_ 2 A**). After MMC treatment, WT cells stopped dividing quickly and compacted their nucleoid (time points 70 and 90 min); they recovered nearly completely in 3h and then entered in stationary phase (**Figure_ 2 A and 2B**). *recN* mutants did not compact their nucleoid after the addition of MMC and filamented extensively. Five hours post treatment, cells were still mainly forming filaments (**Figure_ 2 C and D**). After BLM treatment, WT cells stopped dividing quickly and compacted their nucleoid (**Figure_ 2 E and F**). Interestingly the mean DAPI fluorescence per nucleoid stayed high for 4 hours after the treatment, suggesting that DNA compaction might be prolonged in BLM compared to what we observed in MMC. In good agreement with CFU data, recovery was less efficient than in MMC. This was illustrated by many anucleated cells at time point 6h and a large distribution of the average DAPI fluorescence in the nucleoid (**Figure_ 2 E and F**). The *recN* mutant did not show nucleoid compaction, confirming that this property is linked to RecN and independent on the DNA lesions (Vickridge *et al*, 2017; Odsbu & Skarstad, 2014). Six hours post treatment, most cells did not yet recover a normal morphology (**Figure_ 2 G and H**). Imaging results suggest that RecN activity is essential to induce nucleoid compaction at an early stage of the damage repair phase of MMC and BLM-induced lesions (up to 90 min after the lesion). Interestingly, in the presence of BLM, nucleoid compaction levels at time point 70 – 90 min correlated with the SCC frequencies (high in WT and low in the *recN* strain, **Figure_ 2 C-D and Figure_ 1 D**). In the presence of MMC, the situation differed. Compaction and SCC were initially correlated. However, in the recovery phase, *recN* cells displayed normal SCC frequency (RF \approx 15%) and a disorganized nucleoid (**Figure_ 2 C**). Altogether, our results show different perturbations of nucleoid morphology and sister chromatid dynamics by the processing of MMC or BLM-induced lesions. RecN appears to play different roles in these perturbations, perhaps linked to its partners in the lesion's processing.

TIS analysis of RecN epistasis

Transposon-insertion sequencing (TIS) methods, which combine genome-wide transposon mutagenesis with high-throughput sequencing allows the estimation of fitness contribution or essentiality of each genetic component in a bacterial genome. TIS gives the opportunity to decipher the pathways that led to WT and *recN* mutant survival in response to MMC and BLM toxicity and perhaps to enhance the characterization of its functioning for SC dynamics. TIS relies on fitness differences between Mariner Transposon insertion mutants. We expected to observe the effect of Mariner insertions leading to loss and gain of function in the in the WT and the *recN* strains. TIS analysis were performed in triplicates in identical conditions with three independent extemporaneously generated Mariner libraries of 1 million clones. Bacteria

were submitted, or not, to a 20 min treatment with the drug, washed extensively and plated on LB (Methods). The next day, we collected about 1 million colonies for each sample and extracted genomic DNA. We mapped about 10 million insertions in the genome of *E. coli*. Component analysis revealed a significant dispersion of the replicates (**Supplementary Figure 2A**). We observed that considering the log ratio of treated over untreated samples for each Mariner library reduced the dispersion (**Figure_ 3 A**). This suggests that heterogeneous transposition efficiencies is at the origin of a large part of the difference between replicates. Applied to genes, Principal Component Analysis (PCA) revealed that few genes explain the differences between the samples (**Figure_ 3 B**). Among them were *recN*, the *uvrABC* genes involved in NER, genes from the BAM complex, the *acrAB-tolC* efflux pump, *oxyR* the regulator of oxidative stress response and metabolic genes. We performed a functional enrichment analysis of protein-protein interaction networks with the String tool on selected genes presenting a significant fold change (FC) in each condition (Mean FC < -1 and Pval < 0.1, **Supplementary Figure 2 B**). It revealed clusters of genes important for survival in the four conditions (WT + MMC, WT + BLM, *recN* + MMC, *recN* + BLM). First, both WT and *recN* mutant survival to MMC and BLM depended on a cluster of genes linked to the BAM complex (**Figure_ 3 C-F**). This reflects presumably the requirement for the insertion in the outer membrane of the TolC β barrel protein that functions as a multi drug efflux pump in coordination with AcrA (log₂ FC_{MMC-wt} = -3.6, Pval_{MMC-wt} = 0.09) and AcrB (log₂ FC_{MMC-wt} = -2.8, Pval_{MMC-wt} = 0.06). In addition to AcrAB, TolC cooperates with other efflux systems MdtA, MdtB, MdtC, MdtEF, EmrABC, EmrYK, AcrE and AcrF. However, the corresponding Transposon-insertion were less detrimental for survival in these conditions. These observations suggest that although WT cells and *recN* cells can repair MMC and BLM lesions they cannot do it if the intracellular concentration of the drug is too high. We confirmed this result directly with the *acrA* deletion mutant that showed a very poor viability and was unable to induce SOS nor ParaBAD promoters in the presence of MMC (**Supplementary Figure 3**). The functional clusters formed around the BAM complex also presented genes encoding proteins of diverse functions. Most of them were not common to the four conditions, suggesting that their role might be specific to the drug or the *recN* vs WT backgrounds. We did not analyze them further.

The second cluster of genes that we detected in the TIS data reflects DNA Damage Repair. Interestingly this cluster presented diverse members according to the conditions (**Figure_ 3 C-F**). In the presence of MMC, viability of the WT strain depended on the presence of functional *recN*, *recF*, *uvrABC*, *radA*, *smrA* and *nfo* genes. In the presence of BLM, this cluster changed, it contained *recN*, *sbcB*, *nth*, *endA*, *XseA* and *sbmC*. The absence of *recN* did not change the dependence on *uvrABC*, *recF* and *radA* for MMC survival but revealed new important genes: *exoX* and *rep*. The absence of RecN profoundly modified the gene set required for survival to BLM, it included *recO*, *rep*, *vsr* and *xthA*.

We did not analyze further the other clusters revealed by String but we noticed the presence of genes involved in the stringent response (*dksA*, *relA*), cell division (*zapA*, *zapB*, *ftsN*, *damX*), oxidative phosphorylation/ oxidative stress (*nuoI*, *soxR*, *trxC*) or extracellular appendages

(*csgABGF*, *sfmAC*, *flgC*) suggesting that other cellular pathways were involved in genotoxic drug tolerance.

TIS validation

To control TIS reliability, we constructed mutants of 20 selected genes in WT MG1655. We picked genes that presented TIS FC differences in MMC and BLM. First, we analyzed the gene set as a whole (**Supplementary Figure 4**). In the presence of MMC, TIS results correlated with the CFU for a 20 min treatment (Slope of the linear regression = 0.74, $R^2 = 0.22$). The correlation with the 40 min treatment followed a linear regression with a smaller slope = 0.2, $R^2 = 0.54$. Therefore, TIS data adequately revealed colony formation of MG1655 treated for identical times. Results for the BLM treatment was much less convincing. At 20 min the slope for the linear regression was 0.19 with a $R^2 = -0.075$ and at 40 min the slope = 0.25 with a $R^2 = 0.36$. For individual genes, CFU and TIS data correlated very well for several cases. For example, both TIS and CFU showed the importance of UvrA in MMC but not in BLM. *acrA*, *pyrF*, *borD* and *hfjC* deletions showed viability loss comparable to TIS results in BLM. Interestingly, we also observed gain of function of some Mariner insertions in the *nuoH*, *fruK*, *yeeK* and *ybfE* genes and their corresponding deletions. Altogether, these results validated the TIS analysis as a good predictive tool for genes involved in DNA damage tolerance and repair.

The DDR pathways at play for MMC lesions repair in WT and *recN* strains

To better characterize the DDR pathways involved in MMC and BLM repair, we observed TIS results for the whole gene set annotated for DNA repair (56 genes in Ecocyc, **Figure_ 4**). TIS is not adequate to study genes that present a strong growth disadvantage in the unchallenged condition such as *recA*, *ruvA,B,C* and *priA,B* for example. After MMC challenge, the survival of WT strains was dependent on UvrABC, RecG, RecN, RecF, RecR, SmrA, Rep, RecJ, RadA and Vsr. Mariner insertion mutants in *nfo* (Endonuclease IV), *nth* (Endonuclease III), *rara* and *exoX* presented important mean reductions ($\log_2 FC_{MMC-wt} < 2$) but with the larger deviations between replicates that make them less significant (**Figure_ 4 A**). These observations suggested that different pathways cooperated in the Genomic Stress Response accompanying MMC-induced lesions: NER (UvrABC), homologous recombination (RecF, RecR, RecG, RecN, RadA and RecJ), replication fork stalling (Rep) and perhaps BER (Endo III and IV). UvrABC, RecF, RecR, RecJ, Nfo, Rep, ExoX and RadA were still required in the absence of RecN, suggesting the presence of different epistatic groups in the GSR (**Figure_ 4 B**). We performed CFU measurements of the single *uvrA*, *recF*, *rep* and *radA* and double *recN uvrA*, *recN recF*, *recN rep*, *recN radA* mutants (**Figure_ 4 C and Figure_ 5 A**). Although single *recF*, *rep* and *radA* mutants presented less viability defects than expected from TIS data, we observed significant viability decreases for each double mutants compared to *recN*. This confirmed that RecN and RecF, Rep or RadA belong to different epistasis groups. The relationship between NER and

RecN is discussed below (**Figure_ 5**). Overall TIS results of the WT and *recN* strains correlate well (slope = 0.61, $R^2 = 0.4$, **Figure_ 4 D**). This suggests that although RecN absence changed the viability and morphology of the cells, it did not imply important changes in the GSR. Nevertheless, we observed a few interesting differences between the two strains. First, the inactivation of *recG* was much less detrimental in the *recN* strain ($\log_2 FC_{MMC-recN} = -1.6$) than in the WT ($\log_2 FC_{MMC-wt} = -4.8$). Second, the inactivation of *nth*, encoding Endo III, was detrimental in the WT but slightly beneficial in the *recN* strain. Concomitantly, the selective pressure was much higher on XthA (Exo III) and Nei (Endo VIII) when RecN was absent. Endo III and Endo VI respectively catalyze the first (glycosylase) and second (AP endonuclease) steps of the BER pathway of FapyA and Opyr (Daley *et al*, 2010; Prakash *et al*, 2012). We confirmed these observations by measuring viability of the *xthA* and *recN xthA* mutants (**Figure_ 4 F**). In the absence of RecN, BER intermediates produced by Endo III might become toxic if Endo VI does not process them. The literature proposes that Endo VIII activity is redundant with Endo III, our results alternatively suggest alternatively that processing of MMC-induced lesions by Endo VIII is not equivalent to Endo III. Perhaps because Endo VIII limits the accumulation of toxic depurinated BER intermediates. Altogether, our results suggest that survival to MMC toxicity requires processing by NER, HR and BER. The absence of RecN increased the pressure on the BER (XthA, Nei) and the processing of stalled replication (Rep) while it might concomitantly switch homologous recombination from a RecG dependent pathway to a RecF, RecR, RecJ and RadA dependent pathway.

The DDR pathways at play for BLM lesions repair in WT and *recN* strains

The GSR accompanying BLM-induced lesions were different from those accompanying MMC-induced lesions (**Figure_ 4 A, B and D**). Only *recN*, and *nth* (EndoIII) were important for survival of the WT strain in both conditions. In addition to this small group, TIS revealed a role for SmrAB, EndA, RadA, SbcB (*xonA*), XthA, Nfi and SbmC for the processing of BLM lesions in the WT strain. Obviously, we must also add RecA to this group (**Figure_ 1 A**). According to the literature, these proteins contribute to HR, BER and replication restart pathways. We can split them into two groups according to their importance in the absence of RecN (**Figure_ 4 E and F**). When RecN was absent, *radA*, *sbmC*, *sbcB*, *endA* and *nth* lost their importance (**Figure_ 4 B**) suggesting that their activities were required in a RecN involving pathway(s). The presence of RadA in this group suggests that BLM-induced lesions are processed by an HR pathway that becomes dispensable or deleterious when RecN is absent. The observation that *recB* ($\log_2 FC_{BLM-recN} = 3.13$), *recC* ($\log_2 FC_{BLM-recN} = 0.49$) and *recD* ($\log_2 FC_{BLM-recN} = 1.17$) displayed positive FC in the absence of RecN confirmed this hypothesis. Reckless DNA degradation by RecBCD might explain the poor survival of the *recN* mutant to BLM. The presence of SbcB and Nth in the RecN dependent group, and XthA and Nfi in the RecN independent group suggest that BLM-induced lesions also require a processing by the BER pathway. In addition, the dependence on the Rep helicase ($\log_2 FC_{BLM-recN} = -1.17$ and $\log_2 FC_{BLM-recN} = -3.17$) suggests that replication forks are frequently stalled by BLM-induced lesions in the absence of RecN. We confirmed this hypothesis by CFU measurements, the viability of the single *rep* mutant

was not significantly different from the WT strain but the double *recN rep* mutant showed a strong synergic effect.

We do not yet explain the roles of other DDR genes involved in the repair of BLM-induced lesions: *Sbmc* (a gyrase inhibitor), *EndA* (Endo I, an endonuclease with poorly characterized function), *XseA* (exonuclease VII) and *SmrA* and *SmrB* (small *mutS2*-related A and B, endonucleases with poorly characterized functions). Since CFU confirmed the strong dependence on *SbmC* in the absence of *RecN*, we consider TIS results as a good indicator for future exploration of the GSR accompanying BLM-induced lesions.

Interestingly, *RecG* activity appeared detrimental for the survival to BLM lesions ($\text{Log}_2 \text{FC}_{\text{BLM-wt}} = 2.2$, $\text{Log}_2 \text{FC}_{\text{BLM-recN}} = 1.9$). This differs from previous observations, suggesting that both *RecN* and *RecG* are required for *E. coli* survival of BLM-induced Damages (Kosa *et al*, 2004). We postulated that differences in the experimental protocol (20 min treatment in LB in our case compared to 1h in M9 medium for Kosa and co-workers) could explain this difference: the absence of *RecG* function allows constitutive stable DNA replication (cSDR or SDR) (Hong *et al*, 1995) over replication of the terminus region (Rudolph *et al*, 2013). It is therefore possible that in our experimental conditions cSDR and/or terminus over replication was beneficial for survival.

The involvement of NER differentiates MMC and BLM induced lesion repair

TIS and CFU data showed that MMC and BLM induced lesions both required HR and BER pathways, with *RecN* playing an important role in the flux or the outcome of these processes. In contrast, NER only participates in the GSR accompanying MMC (**Figure_ 4** and **Figure_ 5 A**). Surprisingly, we only observed a modest additive effect when we combined *recN* and *uvrA* deletions (**Figure_ 5 A**). Suggesting that they might contribute to a common pathway. This led us to consider that NER could be responsible for the different sister chromatid dynamics that we observed in response to MMC and BLM-induced lesions. Hi-SC2 and *laclox* assays showed a decrease of SCC in the *uvrA* and *uvrA recN* mutants comparable to that of the *recN* mutant (**Figure_ 5 B** and **C**). Imaging showed nucleoid decondensation in the *uvrA* mutant comparable to the *recN* mutant (**Figure_ 5 D**, **Supplementary Figure 5 A**). These observations suggest that in the absence of NER activity *RecN* has no influence of sister chromatid dynamics and nucleoid morphology. One possible explanation could be that in the absence of NER, SOS was not induced and *RecN* not produced. Although, *RecN* induction was slightly reduced in the presence of MMC in the *uvrA* mutant (**Supplementary Figure 5 B**), its accumulation in the presence of MMC was unchanged (**Figure_ 5 E** and **F**). Following MMC wash, by contrast, *RecN* disappeared much more rapidly in the *uvrA* mutant compared to the WT. This prompted us to consider a putative link between NER activity and *RecN* degradation. Stabilizing *RecN* with a C-terminal Flag epitope restored the *RecN* amount in the *uvrA* strain to a level comparable to the WT. This confirmed that *RecN* stability is the main driver for its low amount in the recovery phase. During the recovery phase following BLM treatment, *RecN* amount was unaffected by the absence of *UvrA* (**Figure_ 5 G**). Therefore, we postulated that NER activity, rather than an

UvrA-RecN interaction, is necessary for RecN stability. Using *dnaC^{ts}* non-replicating cells, we observed that RecN amount is directly dependent on functional NER. This confirmed that NER is the main driver of RecN stability in cells treated with MMC. TIS data show that in the absence of RecN or UvrA, Mariner insertions in the *clpP* and *clpX* genes are much more frequent than in the WT cells (**Supplementary Figure 6 A**). Degradation of unstable DDR genes is therefore detrimental when the repair strategy is not optimal. Altogether these results suggested that in the absence of NER, RecN was rapidly degraded and its amount dropped below a level that allows sister chromatid interactions and optimal repair by HR.

In the NER mutants, survival to MMC toxicity relies on alternative GSR

The lack of NER has strong consequences on the survival to MMC-induced lesions, we observed immediate SCC, nucleoid and cell morphology changes (**Figure_ 5** and **Supplementary Figure 5 A**). To decipher which genetic pathways remain important to allow a small number of cells to survive this treatment we applied TIS to the *uvrA* mutant. As observed for the WT and the *recN* strains, that the AcrAB-TolC efflux system and the BAM complex necessary to its assembly, were crucial for survival (**Figure_ 6 A**). Interestingly, we observed a new set of important genes for survival, these genes are related to oxidative stress: *msrC* and *msrB* (two methionine-(*R*)-sulfoxide reductases (Ezraty *et al*, 2005)), *rsuA* (a pseudouridine synthase, which overexpression increases MIC for hypochlorous acid (Chen *et al*, 2021)), *bcp* (a thiol peroxidase, *bcp* deletion mutants are hypersensitive to peroxides (Mishra & Imlay, 2012)), *fes* (the enterobactin esterase, *fes* mutant is more sensitive to hydrogen peroxide (Peralta *et al*, 2016) and *dps* (a stationary phase DNA binding protein that sequester iron to prevent DNA damage (Calhoun & Kwon, 2011) (**Figure_ 6 B** and **C**). This relationship with oxidative stress was also illustrated by the strong selection for Mariner insertion inside *oxyR* coding for the main regulator of the oxidative stress response in *E. coli* and the *nuo* genes coding for non-essential proteins of the respiratory chain (**Figure 6B**). Another pathway emerged from the TIS analysis: enzymes involved in RNA metabolism and turnover (*greA*, *rnhA*, *rnb*, *pnp*, *deaD*, *smrB*). Mariner insertions in all these genes are positively selected in the presence of MMC (**Figure_ 6 B**). Finally, we observed that among DDR genes only RecN and *recO* kept a role in the *uvrA* mutant (**Figure_ 6 D**) while insertions in *clpP* were positively selected (**Supplementary Figure 6**), suggesting that an alternative repair pathway requiring the maximum possible amount of RecN was still active in these conditions and allowed a minimal survival of some cells. Altogether, our results suggest a positioning of RecN at the crossroad of multiple repair pathways, playing a role in activating HR and facilitating the functioning of the BER pathway, stimulated by NER to promote sister chromatid and nucleoid remodeling and perhaps functioning in a yet uncharacterized pathway with RecO but not RecF and RecR.

1.4 Discussion

TIS is adequate to survey epistasis at the whole genome level

To characterize the epistasis relationships between RecN and other genes of the *E. coli* genome we used Transposon insertion sequencing (TIS). TIS is a powerful approach that can be extensively applied to the genome-wide definition of loci that are required for bacterial growth under diverse conditions (Elhenawy *et al*, 2021; Prudent *et al*, 2021). However, to our knowledge, TIS has not yet been used to analyze DDR and GSR in response to a treatment with genotoxic compounds. Experimental design choices and stochastic biological processes can heavily influence the results of TIS experiments and affect downstream statistical analysis (Chao *et al*, 2016). The power of any TIS study is greatly influenced by the complexity of the initial library generated and the maintenance of this complexity during selection. In *E. coli*, the DDR is usually analyzed with CFU that reflect very low survival rates of WT or mutant strains (Picksley *et al*, 1984; Michel *et al*, 2000). In such conditions bottleneck effects are unavoidable and might bias TIS statistical analysis. To limit these biases, we created a library with 2 million independent clones and worked with short exposure to low doses of MMC and BLM. We constructed mutants of the genes with more than 20 TIS hits and tested them by CFU. For the stronger TIS hits (*acrA* and *acrB*, *uvrA*, *recN*, *xthA*...) the correlation between TIS data and CFU was perfect (**Supplementary Figure 4**). However, for genes that presented a small fitness loss ($> \text{Log}_2 \text{FC} = -1$) revealed by TIS, the correlation with CFU was not satisfactory. This suggests that according to the experimental conditions, different sets of genes might be revealed by TIS. Therefore, in future experiments, dose response or duration of the treatment could be tuned to reveal different faces of the GSR.

TIS reveals the GSR

Although the genotoxic activities of MMC and BLM were characterized several decades ago (Suzuki & Kilgore, 1967; Burger *et al*, 1981) and their usage in cancer therapy initiated in the 80's (Garewal, 1988), the Genotoxic Stress Response (GSR) associated with those antibiotics in *E. coli*, and other bacteria, remains incompletely characterized. Although, several screens were carried out to identify genes conferring a hypersensitivity to MMC and BLM (Becket *et al*, 2010), these studies only focused on WT *E. coli* and therefore did not question epistasis relationships. The originality of our study was to perform TIS in three different genetic backgrounds (WT, *recN* and *uvrA* mutants) and two drugs. This strategy allowed us to propose an integrated model of the GSR that includes equilibrium changes in the different contexts (**Figure_ 7**).

RecN plays major roles in nucleoid compaction and sister chromatid cohesion

Previous literature indicated that three DDR proteins were required in common for the survival to BLM and MMC toxicity: RecA, RecN and RecG; among them RecN activities were

the less characterized. Previous data indicated that RecN, an SMC protein, works to maintain two DNA strands in close contact (Vickridge *et al*, 2017; Pellegrino *et al*, 2012; Keyamura & Hishida, 2019). It was therefore proposed that RecN tethered DNA ends or maintained homologous or non-homologous regions in contact as cohesins do. To decipher the role(s) of RecN during the repair of MMC and BLM we used a genome wide SCC assay (**Figure_ 1 C**). It revealed different sister chromatid dynamics associated with RecN activity on chromosomes altered by MMC-induced lesions compared to BLM-induced lesions. We observed that RecN contributes to maintaining SCC along the whole genome in the presence of MMC but it played no role during the recovery period, after the wash of the drug. By contrast, RecN did not influence initial SCC in the presence of BLM but played an important role during the recovery period to produce extra interactions between SC. Surprisingly this difference did not correlate with nucleoid compaction which was entirely under the control of RecN in both MMC and BLM treatment. These observations suggest that these two events, Sister chromatid cohesion and nucleoid compaction, might not reflect the same RecN activity. A partnership between RecN and NER in the GSR accompanying MMC-induced lesion might explain this difference. We propose that MMC-induced lesions are rapidly processed by NER in a way that allows massive loading of RecN at multiple places on the chromosome. Since RecN prefers single strand DNA for binding it is tempting to propose that in MMC conditions many NER processing events are not complete and generate single strand DNA (Weng *et al*, 2010). The observation that in the absence of DNA replication NER was required to induce RecN and presumably every SOS gene, confirmed this hypothesis. Once loaded, RecN prevents segregation of sister loci and provokes nucleoid compaction. In the recovery phase, the progressive repair of single stranded regions shall favor RecN unloading and its subsequent degradation.

In the presence of BLM, RecN activity was only visible later during the recovery phase. One possible explanation for this observation is that adequate single strand DNA substrates are not immediately available for RecN. BLM lesions produce double strand breaks that will be processed by RecBCD and covered by SSB and RecA. Since RecN is only induced at this stage, we speculate that it may function only after the initial homology search and D loop formation by RecA. At this timing, its loading on SS DNA could stabilize D loops as observed *in vitro* (Reyes *et al*, 2010). Replication on these RecN loaded substrates, (from oriC, from repair intermediates or from the terminus region) might explain the important increase of SCC that we observed in the recovery phase.

RecN is at the crossing point between different repair strategies

Combining Hi-SC2, TIS, imaging and viability assays we can propose an integrated picture of the GSR accompanying MMC and BLM-induced lesions. Interestingly we observed the key roles that RecN plays in these GSR. RecN is positioned at the crossroad of multiple repair pathways, playing a role in activating HR and facilitating the functioning of the BER pathway and stimulated by NER to promote sister chromatid and nucleoid remodeling (**Figure 7**). The strong requirement for a preprocessing of MMC-induced lesions to stabilize RecN and promote SCC and presumably HR was unexpected; although it is well appreciated that HR and

NER work in coordination (Li & Heyer, 2008; Ide *et al*, 2008), the strong requirement of NER processing for the activity of an HR protein partner has not yet been described in *E. coli*. Recently, a similar partnership was described for NER and TLS in non-replicating *C. crescentus* bacterium (Joseph *et al*, 2021), such partnerships might therefore be more frequent than expected during GSR. Future genome wide epistasis analysis with TIS might help to reveal their nature and complexity. Our MMC results suggest that RecN loads frequently on SS gaps generated by imperfect NER or BER processing. The strong dependency on RecN for the repair of DSB generated by endonucleases suggests that it is also active on RecBCD processed events, although in the presence of MMC such events seem to be rare. The loading of RecN on BLM-injured DNA remains unclear; because we observed its consequence on SCC later in the recovery process we suspect that it correspond to a late step of the GSR. Perhaps linked to the accumulation of SS gaps during HR or Break Induced Replication.

1.5 Material and Methods

Strains and plasmids. All strain and plasmids used in this study are described in Supplementary table 1. All strains are derived from wild-type MG1655 or MG1656 ($\Delta lac MluI$). Strains constructions were done by either P1 transduction or Lambda Red technique gene replacement. The 3X-FLAG peptide was inserted by homologous recombination in C-terminal of RecN.

Media. Most of the experiment were performed in LB (1 % de bacto-typtone, 0.5 % yeast extract, 1 % de NaCl, pH 7.5) or on LB-agar (LB + 1.5 % de bacto-agar). Some were realized in minimum media A (MMA : 1x (0.26 M KH_2PO_4 , 0.06 M K_2HPO_4 0.01M tri-sodium citrate, 2 mM $MgSO_4$, 0.04 M $(NH_4)_2 SO_4$) 0.2% casamino acid and 0.2% glucose.

SOS response expression essay. An overnight culture of strains containing the plasmid pRecN_GFP or pcgcGi was diluted 1/200 in LB, then growth DO_{600nm} : 0.1 at 37°C and 250 μ l were deposited per well. At DO_{600nm} : 0.2 BLM or MMC was added at concentrations of 5 μ g/ml or 1 μ g/ml respectively, with 0.1% arabinos when required.

Western Blotting. Protein's extraction was performed from an overnight *E. coli* cell culture. 1 ml of cell in exponential phasis in LB, DO_{600nm} : 0.3, was taken, centrifuged 3 min 6 000 x *g*. The pellet was resuspended in 100 μ l (Trizma 20 mM pH8, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, for 50ml mix with 1 tablet « Complete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail ROCHE » (MERCK), and 1 μ l de « Ready-Lyse™ Lysozyme » solution (MERCK). The cells were lysed, and DNA fragmented by sonication. Then centrifuged 15 min 15 000 x *g* 4°C. 100 μ l of supernatant were collected and mixed in 100 μ l of buffer Laemmli 2X, then incubated 10 min 95°C. Electrophoresis samples were deposited in a denaturing polyacrylamide gel with gradient 4-15%, ou 7,5% « Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast Gels » (BIO-RAD). The migration is done in buffer TGS. Primary antibodies were diluted 1/1 000^e, secondary antibody at 1/5 000^{eme}. The anti-RNA-pol Beta antibody coupled to the HRP enzyme were added at the same time (« Direct-Blot HRP anti-*E. coli* RNA Polymerase beta » de OZYME) 1/20 000^{eme}. The results are expressed as the ratio of the amount of RecN to the amount of RNA polymerase Beta.

Tn-Seq. Library production. Tn-Seq was performed as described (Yamaichi and Dorr 2017) by conjugation from *E. coli* SM10 MFD pir carrying pSC189, with in *E. coli* MG1655 isogenic strain. More than 1 million independent clones, were plated on LBA supplemented with Kanamycin and DAP when required, overnight at 30°C to get isolated colonies. The day after, all colonies from the dishes were recovered and mixed in 30ml LB. OD was adjusted to OD_{600nm} : 0.03 in 45ml LB at 30°C 150rpm and grown to OD_{600nm} : 0.15. The genotoxic agent (MMC 5 μ g/ml or BLM 1 μ g/ml) was added for 20 min. To remove it, two washes were performed. Once the washes were completed, survival cells were spread to target 500k and 1000k colonies with

isolated colonies plated ON 30°C LBA. Construction of the sequencing library was performed as described in the protocol (Yamaichi and Dorr 2017).

Hi-SC2. Hi-SC2 was performed in a similar way to (Espinosa, Paly, and Barre 2020). The *loxP* sites were introduced by conjugation and transposition. The conjugation were performed between *E. coli* β -2163 pSWT23 (Demarre et al. 2005)(van Opijnen, Bodi, and Camilli 2009) and *E. coli* MG1655, this last one has the recombination system Cre, previously introduced on the genome by recombination to *lacZ* site. The transposon is used here as a vector to introduce the *loxP* sites. Transposition bank is done in the same way as the Tn-seq protocol in presence of DAP (0.6 mM) for the donor strain β -2163 and the recipient strain possessing Cre in presence of 0.1 mM IPTG. Once the library is made, it is frozen at -80°C with 50% glycerol. Hi-SC2 essay. Aliquots of the transposition library were placed on ice for thawing. Cells were grown to exponential growth phase (OD₆₀₀: 0.2) from 10⁸ cells diluted in 100ml LB with IPTG (OD₆₀₀ : 0.05). Then 1ml of culture is centrifuged and transferred into 40ml of new culture medium without IPTG at 30°C 180 rpm. After 90 min, when OD₆₀₀: 0.1 is reached (i.e. about 1.10⁸ cells), the genotoxic agent is added for 20 min. Then, three washes were performed. Then 0.1% arabinose is added for 60 minutes with or without recovery time. 10ml were pelleted, then frozen without the supernatant in liquid nitrogen and stored at -20°C, before gDNA extraction. (The analysis scripts are available in **Annexe 8, Annexe 9, Annexe 10**).

Microscopy. An overnight culture was diluted 1/200 in LB or MM A supplemented with 0.2% casamino acids and 0.2% glucose. The cells were grown to an OD_{600nm} : 0.2 at 37 °C. We observe the bacteria on 1% agarose melted in GTE. The images were taken on Zeiss Axio. Observed with an objective 63X PL-APO, NA 1.40. The acquisition was done with ZEN software and the processing and analysis of the images with Fiji software and its application MicrobeJ.

Acknowledgements

This work was supported by ANR grant (Bach) to FX, MM and OE and ANR grant (Persist3R) to OE, by the Fondation ARC to OE. We thank Phillipe Bouloc, Stephane Duigou and Arnaud Gutierrez for the gift of strains and plasmids.

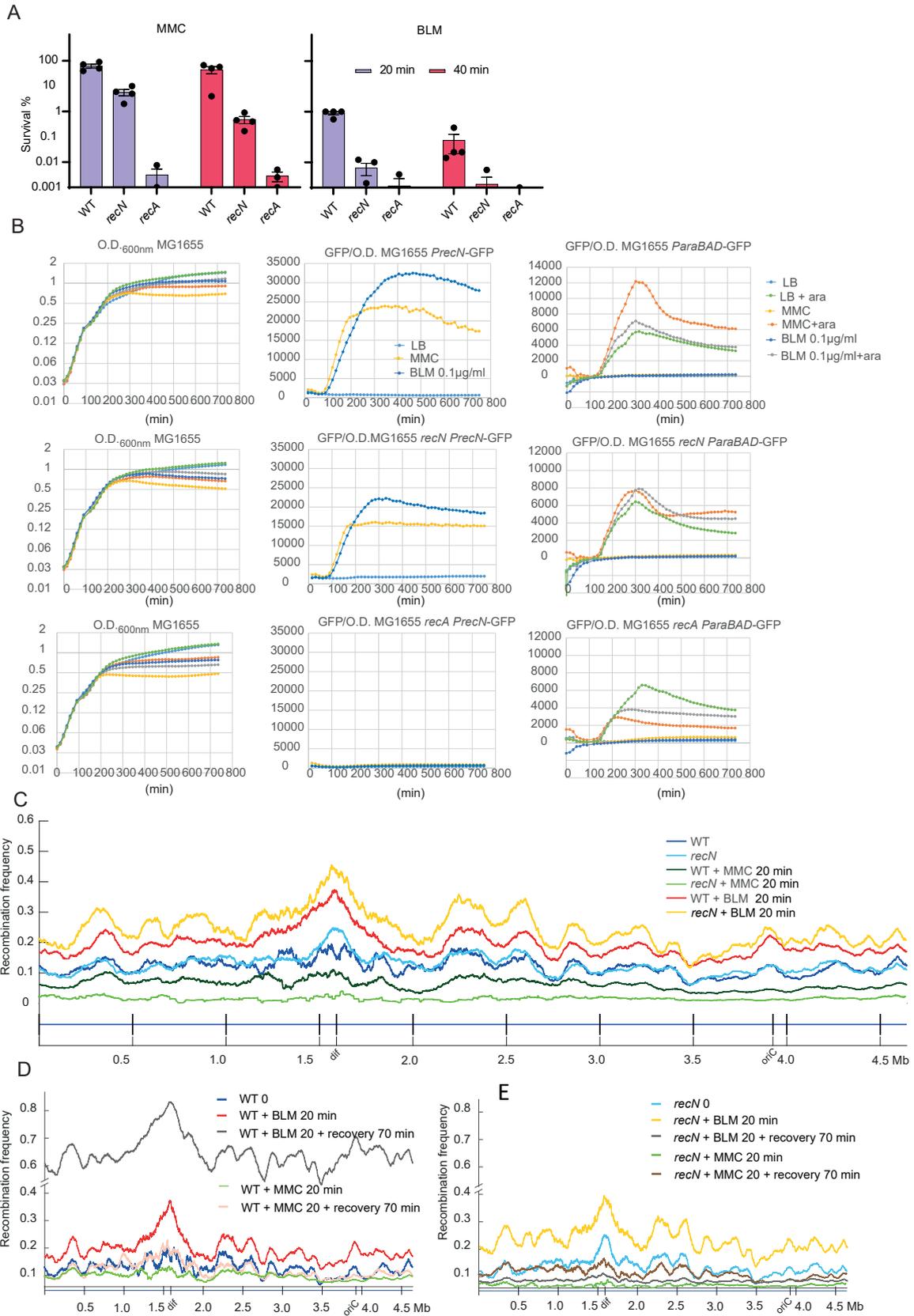
1.6 References

- Becket E, Chen F, Tamae C & Miller JH (2010) Determination of hypersensitivity to genotoxic agents among *Escherichia coli* single gene knockout mutants. *DNA Repair (Amst)* 9: 949–957
- Bhattacharyya S, Soniat MM, Walker D, Jang S, Finkelstein IJ & Harshey RM (2018) Phage Mu Gam protein promotes NHEJ in concert with *Escherichia coli* ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: E11614–E11622
- Burger RM, Peisach J & Horwitz SB (1981) Activated bleomycin. A transient complex of drug, iron, and oxygen that degrades DNA. *J Biol Chem* 256: 11636–11644
- Calhoun LN & Kwon YM (2011) Structure, function and regulation of the DNA-binding protein Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*: a review. *J Appl Microbiol* 110: 375–386
- Chao MC, Abel S, Davis BM & Waldor MK (2016) The design and analysis of transposon insertion sequencing experiments. *Nat Rev Microbiol* 14: 119–128
- Chen H, Wilson J, Ercanbrack C, Smith H, Gan Q & Fan C (2021) Genome-Wide Screening of Oxidizing Agent Resistance Genes in *Escherichia coli*. *Antioxidants (Basel)* 10: 861
- Chen J, Ghorai MK, Kenney G & Stubbe J (2008) Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage. *Nucleic Acids Res* 36: 3781–3790
- Daley JM, Zakaria C & Ramotar D (2010) The endonuclease IV family of apurinic/aprimidinic endonucleases. *Mutat Res* 705: 217–227
- Derks KWJ, Hoeijmakers JHJ & Pothof J (2014) The DNA damage response: the omics era and its impact. *DNA Repair (Amst)* 19: 214–220
- Elhenawy W, Hordienko S, Gould S, Oberc AM, Tsai CN, Hubbard TP, Waldor MK & Coombes BK (2021) High-throughput fitness screening and transcriptomics identify a role for a type IV secretion system in the pathogenesis of Crohn's disease-associated *Escherichia coli*. *Nat Commun* 12: 2032
- Espinosa E, Paly E & Barre F-X (2020) High-Resolution Whole-Genome Analysis of Sister-Chromatid Contacts. *Mol Cell* 79: 857-869.e3
- Ezraty B, Aussel L & Barras F (2005) Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta* 1703: 221–229
- Garewal HS (1988) Mitomycin C in the chemotherapy of advanced breast cancer. *Semin Oncol* 15: 74–79
- Hanawalt PC (2015) Historical perspective on the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* 36: 2–7
- Hong X, Cadwell GW & Kogoma T (1995) *Escherichia coli* RecG and RecA proteins in R-loop formation. *EMBO J* 14: 2385–2392

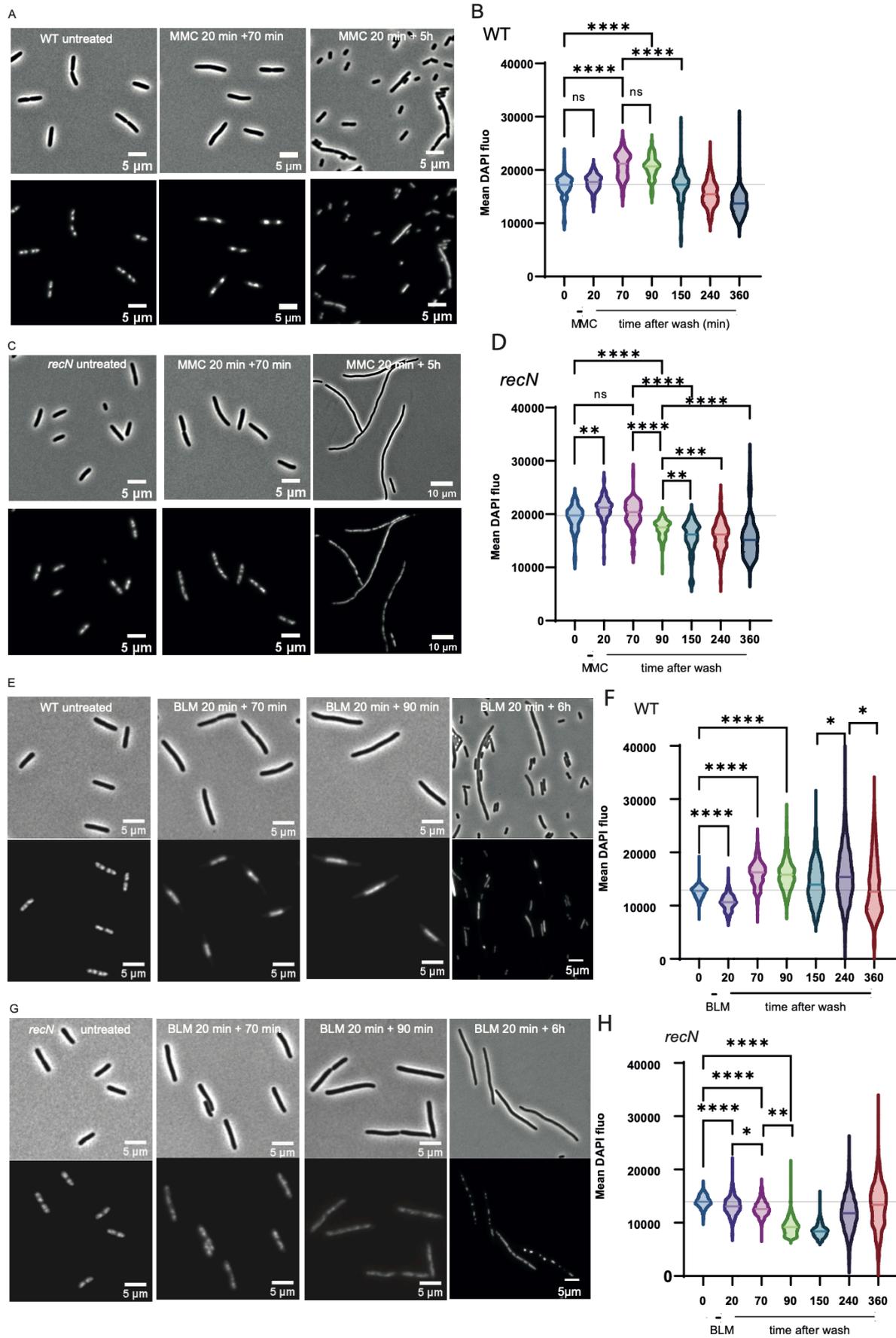
- Ide H, Nakano T, Salem AMH, Terato H, Pack SP & Makino K (2008) Repair of DNA-protein crosslink damage: coordinated actions of nucleotide excision repair and homologous recombination. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*: 57–58
- Joseph AM, Daw S, Sadhir I & Badrinarayanan A (2021) Coordination between nucleotide excision repair and specialized polymerase DnaE2 action enables DNA damage survival in non-replicating bacteria. *Elife* 10: e67552
- Keller KL, Overbeck-Carrick TL & Beck DJ (2001) Survival and induction of SOS in *Escherichia coli* treated with cisplatin, UV-irradiation, or mitomycin C are dependent on the function of the RecBC and RecFOR pathways of homologous recombination. *Mutat Res* 486: 21–29
- Keyamura K & Hishida T (2019) Topological DNA-binding of structural maintenance of chromosomes-like RecN promotes DNA double-strand break repair in *Escherichia coli*. *Commun Biol* 2: 413
- Keyamura K, Sakaguchi C, Kubota Y, Niki H & Hishida T (2013) RecA protein recruits structural maintenance of chromosomes (SMC)-like RecN protein to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 288: 29229–29237
- Klimova AN & Sandler SJ (2020) An Epistasis Analysis of recA and recN in *Escherichia coli* K-12. *Genetics* 216: 381–393
- Kosa JL, Zdraveski ZZ, Currier S, Marinus MG & Essigmann JM (2004) RecN and RecG are required for *Escherichia coli* survival of Bleomycin-induced damage. *Mutat Res* 554: 149–157
- Kushner SR (1974) In vivo studies of temperature-sensitive recB and recC mutants. *J Bacteriol* 120: 1213–1218
- Lesterlin C, Gigant E, Boccard F & Espéli O (2012) Sister chromatid interactions in bacteria revealed by a site-specific recombination assay. *EMBO J* 31: 3468–3479
- Li X & Heyer W-D (2008) Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* 18: 99–113
- Lossius I, Krüger PG, Male R & Kleppe K (1983) Mitomycin-C-induced changes in the nucleoid of *Escherichia coli* K12. *Mutat Res* 109: 13–20
- Matic I (2018) The major contribution of the DNA damage-triggered reactive oxygen species production to cell death: implications for antimicrobial and cancer therapy. *Curr Genet* 64: 567–569
- Mendoza-Chamizo B, Løbner-Olesen A & Charbon G (2018) Coping with Reactive Oxygen Species to Ensure Genome Stability in *Escherichia coli*. *Genes* 9: 565
- Michel B, Recchia GD, Penel-Colin M, Ehrlich SD & Sherratt DJ (2000) Resolution of holliday junctions by RuvABC prevents dimer formation in rep mutants and UV-irradiated cells. *Mol Microbiol* 37: 180–191
- Mishra S & Imlay J (2012) Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? *Arch Biochem Biophys* 525: 145–160

- Odsbu I & Skarstad K (2014) DNA compaction in the early part of the SOS response is dependent on RecN and RecA. *Microbiology (Reading)* 160: 872–882
- Pellegrino S, Radzimanowski J, de Sanctis D, Boeri Erba E, McSweeney S & Timmins J (2012) Structural and functional characterization of an SMC-like protein RecN: new insights into double-strand break repair. *Structure* 20: 2076–2089
- Peralta DR, Adler C, Corbalán NS, Paz García EC, Pomares MF & Vincent PA (2016) Enterobactin as Part of the Oxidative Stress Response Repertoire. *PLoS One* 11: e0157799
- Picksley SM, Attfield PV & Lloyd RG (1984) Repair of DNA double-strand breaks in *Escherichia coli* K12 requires a functional recN product. *Mol Gen Genet* 195: 267–274
- Prakash A, Doublé S & Wallace SS (2012) The Fpg/Nei family of DNA glycosylases: substrates, structures, and search for damage. *Prog Mol Biol Transl Sci* 110: 71–91
- Prudent V, Demarre G, Vazeille E, Wery M, Quenech’Du N, Ravet A, Dauverd-Girault J, van Dijk E, Bringer M-A, Descrimes M, *et al* (2021) The Crohn’s disease-related bacterial strain LF82 assembles biofilm-like communities to protect itself from phagolysosomal attack. *Commun Biol* 4: 627
- Reyes ED, Patidar PL, Uranga LA, Bortoletto AS & Luseti SL (2010) RecN is a cohesin-like protein that stimulates intermolecular DNA interactions in vitro. *J Biol Chem* 285: 16521–16529
- Rudolph CJ, Upton AL, Stockum A, Nieduszynski CA & Lloyd RG (2013) Avoiding chromosome pathology when replication forks collide. *Nature* 500: 608–611
- Steighner RJ & Povirk LF (1990) Bleomycin-induced DNA lesions at mutational hot spots: implications for the mechanism of double-strand cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 8350–8354
- Suzuki H & Kilgore WW (1967) Effects of mitomycin C on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 93: 675–682
- Vickridge E, Planchenault C, Cockram C, Junceda IG & Espéli O (2017) Management of *E. coli* sister chromatid cohesion in response to genotoxic stress. *Nat Commun* 8: 14618
- Warr AR, Klimova AN, Nwaobasi AN & Sandler SJ (2019) Protease-deficient SOS constitutive cells have RecN-dependent cell division phenotypes. *Mol Microbiol* 111: 405–422
- Weng M, Zheng Y, Jasti VP, Champeil E, Tomasz M, Wang Y, Basu AK & Tang M (2010) Repair of mitomycin C mono- and interstrand cross-linked DNA adducts by UvrABC: a new model. *Nucleic Acids Res* 38: 6976–6984
- Xu T, Brown W & Marinus MG (2012) Bleomycin sensitivity in *Escherichia coli* is medium-dependent. *PLoS One* 7: e33256

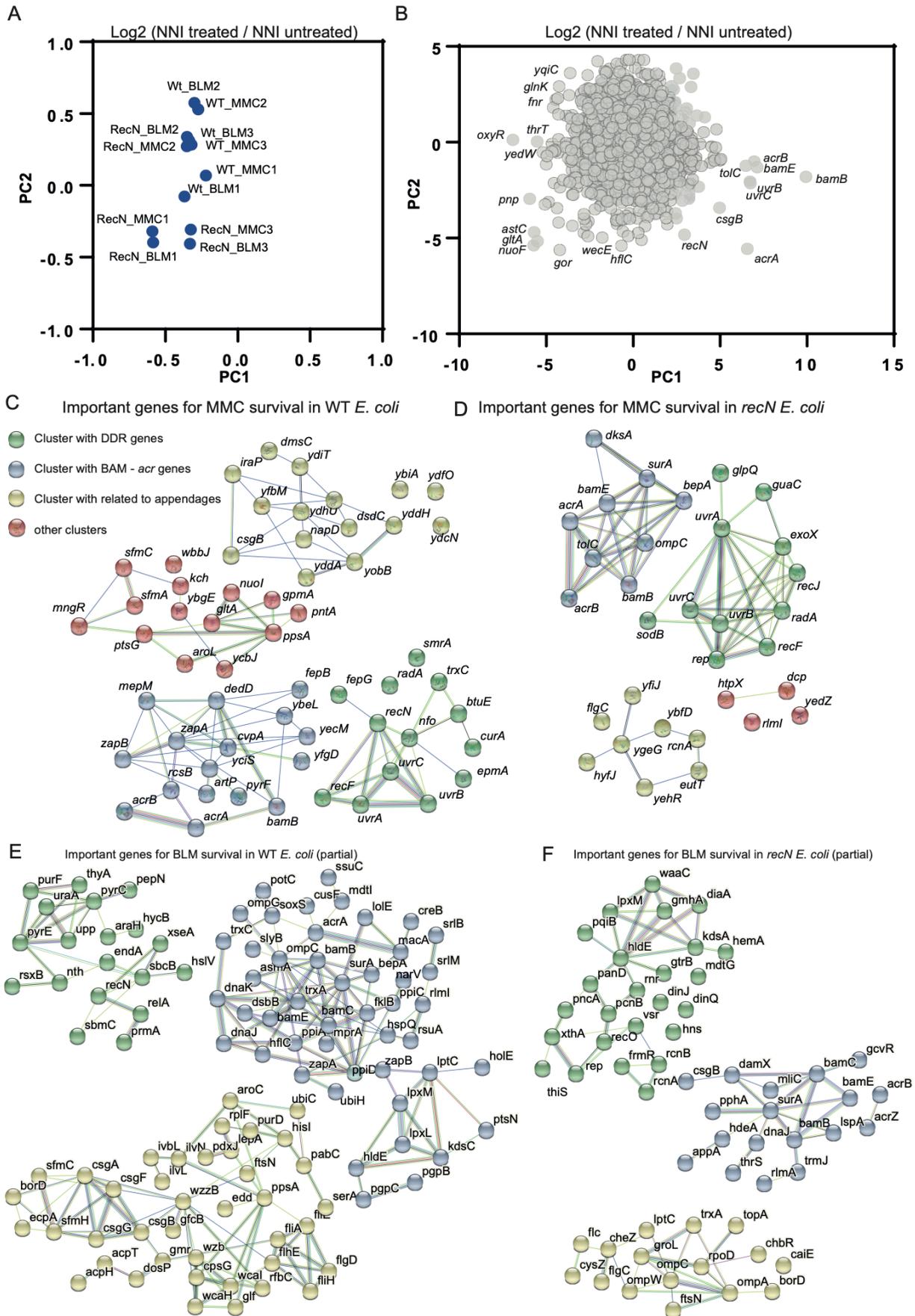
1.7 Figures



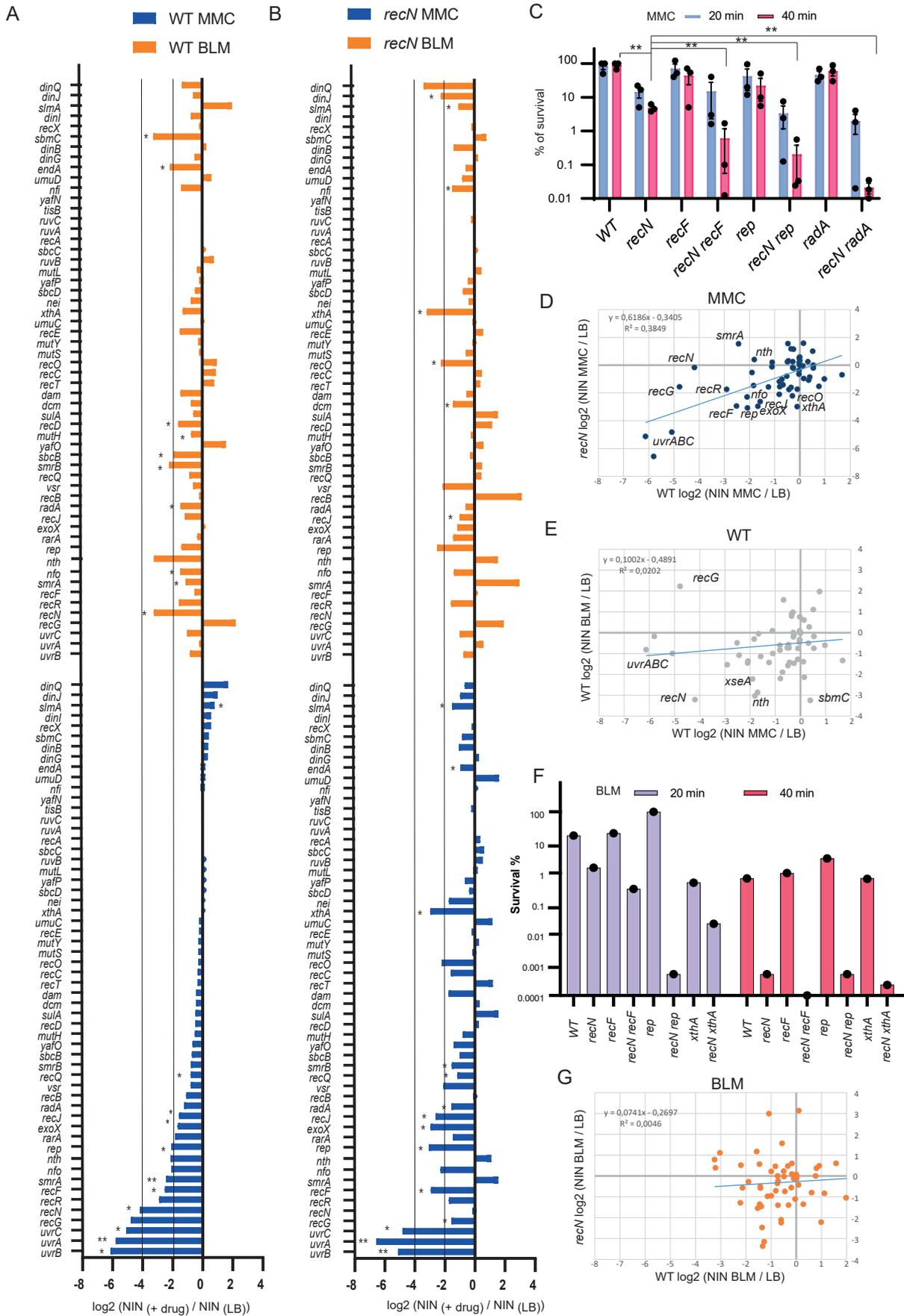
Figure_ 1. **A)** CFU of WT and RecN in the presence of MMC or BLM. **B)** Growth and SOS and arabinose promoters expression in the presence of MMC and BLM. Both drugs were added at the time point 90 min. **C)** Hi-SC2 profile of sister chromatid interactions in the WT and *recN* mutant in the presence or absence of MMC or BLM. **D)** Hi-SC2 profile of WT and *recN* strains recovering from a 20 min MMC injury. **E)** Hi-SC2 profile of WT and *recN* strains recovering from a 20 min BLM injury.



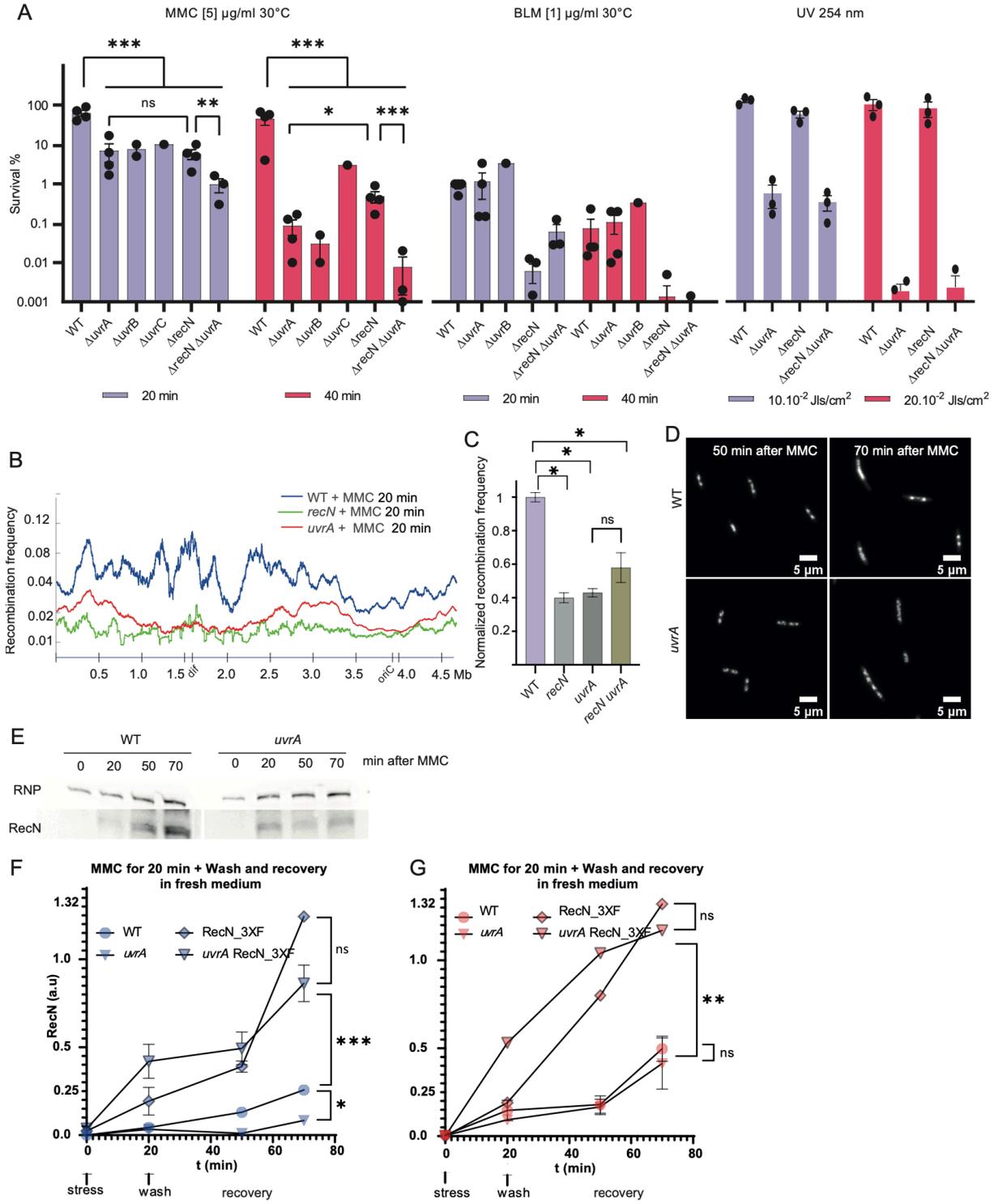
Figure_ 2 **A)** Observation of cells and nucleoid of WT cells treated with MMC **B)** Quantification of the mean DAPI fluorescence in the nucleoid area of WT cells treated with MMC. **C)** Same as A for the *recN* mutant. **D)** Same as B for the *recN* mutant. **E)** Observation of cells and nucleoid of WT cells treated with BLM. **F)** Quantification of the mean DAPI fluorescence in the nucleoid area of WT cells treated with BLM. **G)** Same as D for the *recN* mutant. **H)** Same as F for the *recN* mutant. N=500, Anova statistical test * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.00005.



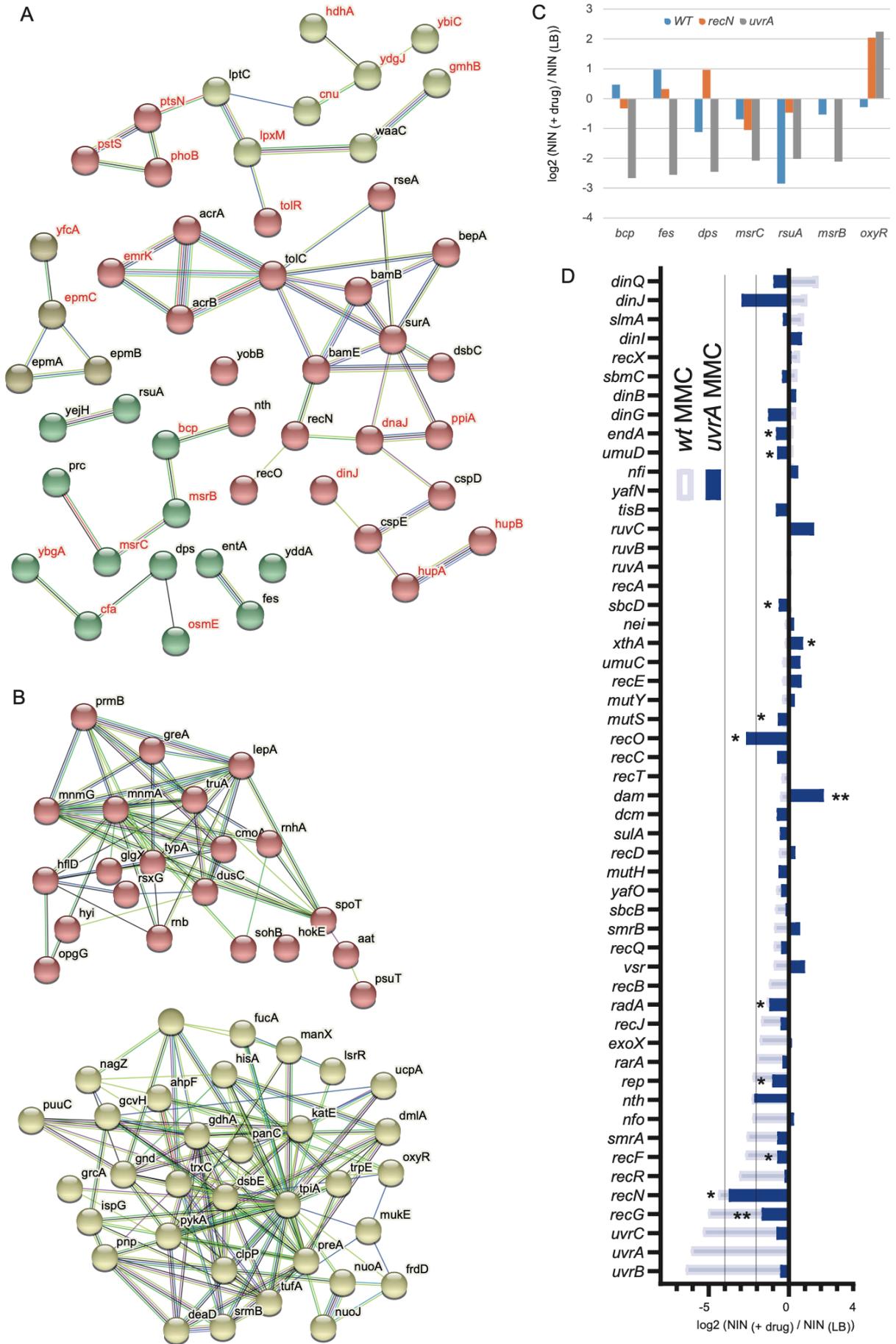
Figure_ 3. **A)** Principal component analysis of TIS data. Fold change (Log_2 (NNI treated / NNI untreated)) were used to cluster conditions and replicates. **B)** TIS fold change were used to cluster genes. **C)** Functional Kmeans clustering (<https://string-db.org>, medium confidence score) of important genes ($\text{Log}_2 \text{FC}_{\text{MMC-wt}} < -2$, P value < 0.1) for MMC survival in WT *E. coli*. **D)** Functional Kmeans clustering of important genes for MMC survival in the *recN* strain. **E)** Functional Kmeans clustering of important genes for BLM survival in WT *E. coli*. Only a portion of the genes was represented (63/123). **F)** Functional Kmeans clustering of important genes for BLM survival in the *recN* strain. Only a portion of the genes were represented (52/95).



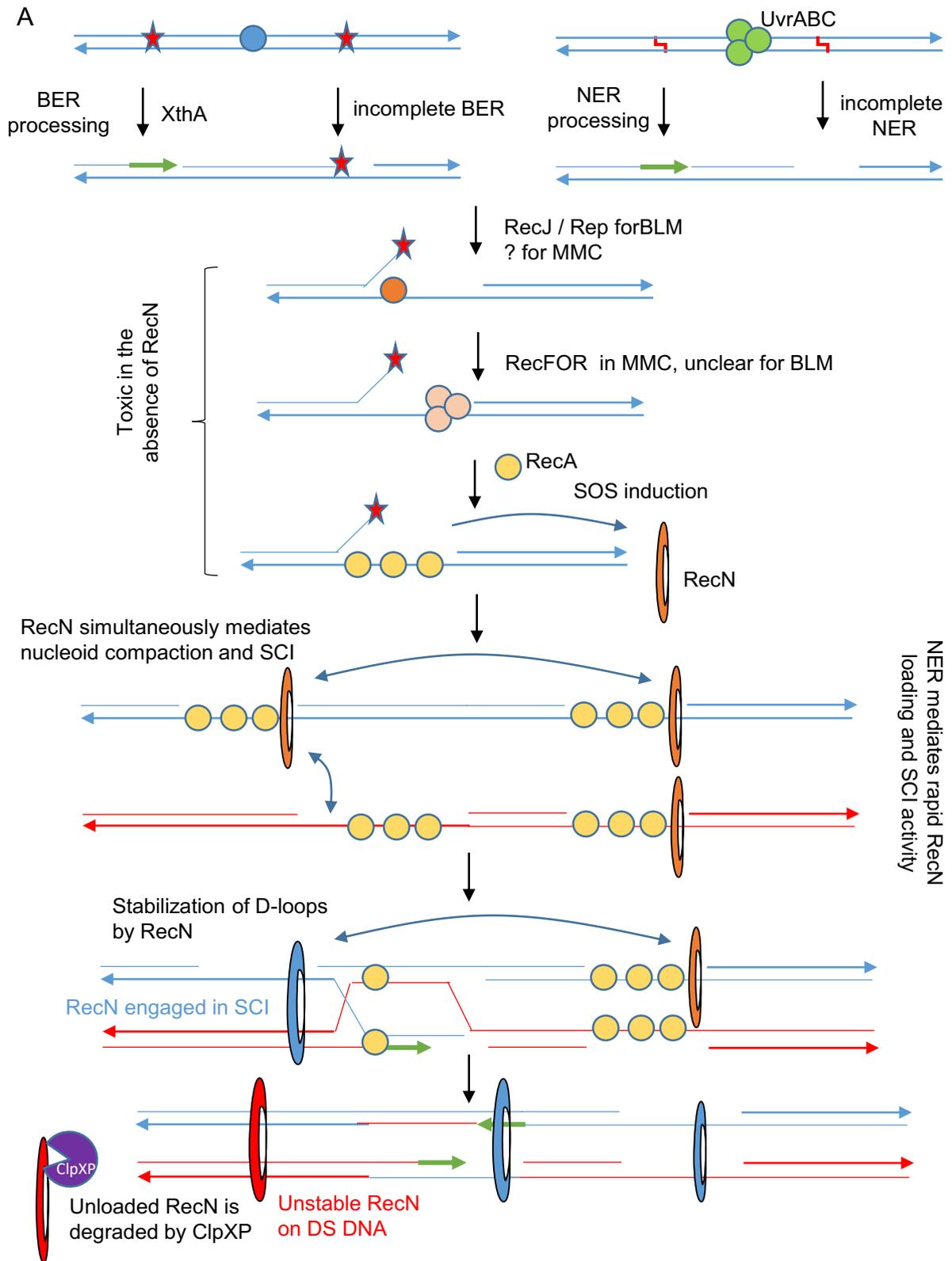
Figure_ 4. **A)** TIS results in the presence of MMC or BLM for the subset of *E. coli* DDR genes in the WT strain. **B)** same as A for the *recN* strain. **C)** CFU analysis of the WT, *recN*, *recF*, *rep* and *radA* single and double mutants in the presence of MMC. **D)** Comparison of the TIS results in MMC for the WT and *recN* strain $\text{Log}_2 \text{FC}_{\text{MMC-WT}}$ vs $\text{Log}_2 \text{FC}_{\text{MMC-recN}}$. **E)** Comparison of the TIS results of the WT strain in MMC and BLM, $\text{Log}_2 \text{FC}_{\text{MMC-wt}}$ vs $\text{Log}_2 \text{FC}_{\text{BLM-wt}}$. **F)** CFU analysis of the WT, *recN*, *recF*, *rep* and *xthA* single and double mutants in the presence of BLM. **G)** Comparison of the TIS results in *recN* strain, $\text{Log}_2 \text{FC}_{\text{MMC-recN}}$ vs $\text{Log}_2 \text{FC}_{\text{BLM-recN}}$.

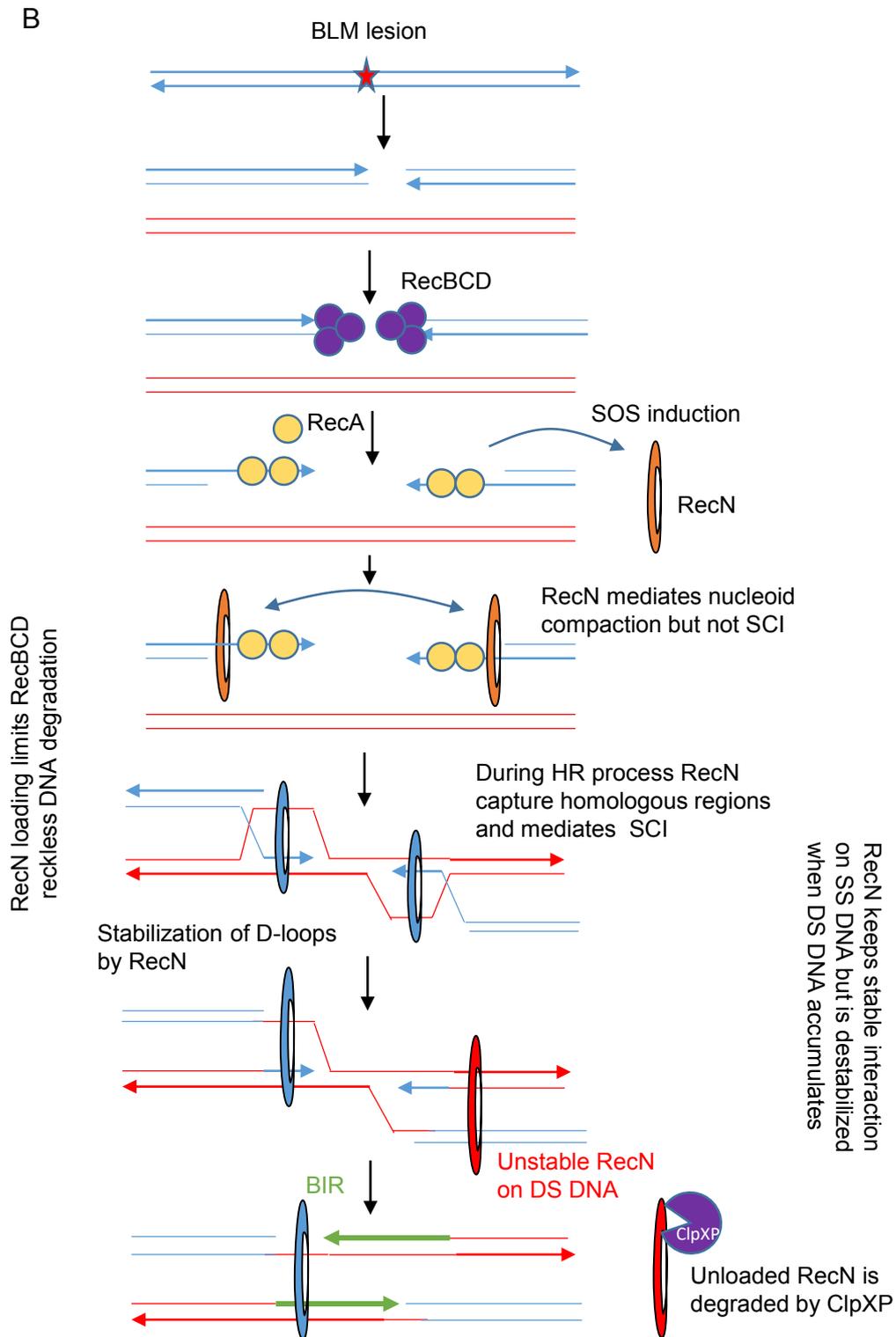


Figure_ 5. **A)** CFU analysis of the WT, *recN*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* single and double mutants in the presence of MMC, BLM, and UV irradiation. **B)** Hi-SC2 profile of sister chromatid interactions in the WT, *recN* and *uvrA* mutants in the presence or absence of MMC. **C)** Measure of inter sister locus recombination, laclox assay, in the WT, *recN*, *uvrA* and *recN uvrA* mutants. **D)** Nucleoid imaging of the WT strain and *uvrA* mutant during the recovery period of MMC injury. The full kinetic is presented on **Supplementary Figure 5 A**. **E)** Measure of RecN production by western blot in the WT and *uvrA* strain in the presence of MMC. **F)** Measure of RecN and RecN 3X-flag turnover in the WT and *uvrA* mutant during the recovery period of MMC injury. **G)** Measure of RecN and RecN 3X-flag turnover in the WT and *uvrA* mutant during the recovery period of BLM injury.



Figure_ 6. **A)** Functional Kmeans clustering of important genes for MMC survival in the *uvrA* strain. **B)** Functional Kmeans clustering of the genes counter selected for MMC survival in the *uvrA* strain. **C)** TIS results for the *bcp*, *fes*, *dps*, *msrC*, *rsuA*, *msrB*, and *oxyR* genes in the WT, *recN* and *uvrA* mutants. Data are expressed as the difference between the mean NIN in the treated condition and the mean NIN in the untreated conditions. **D)** TIS results in the presence of MMC for the subset of *E. coli* DDR genes in the *uvrA* strain compared to the WT.

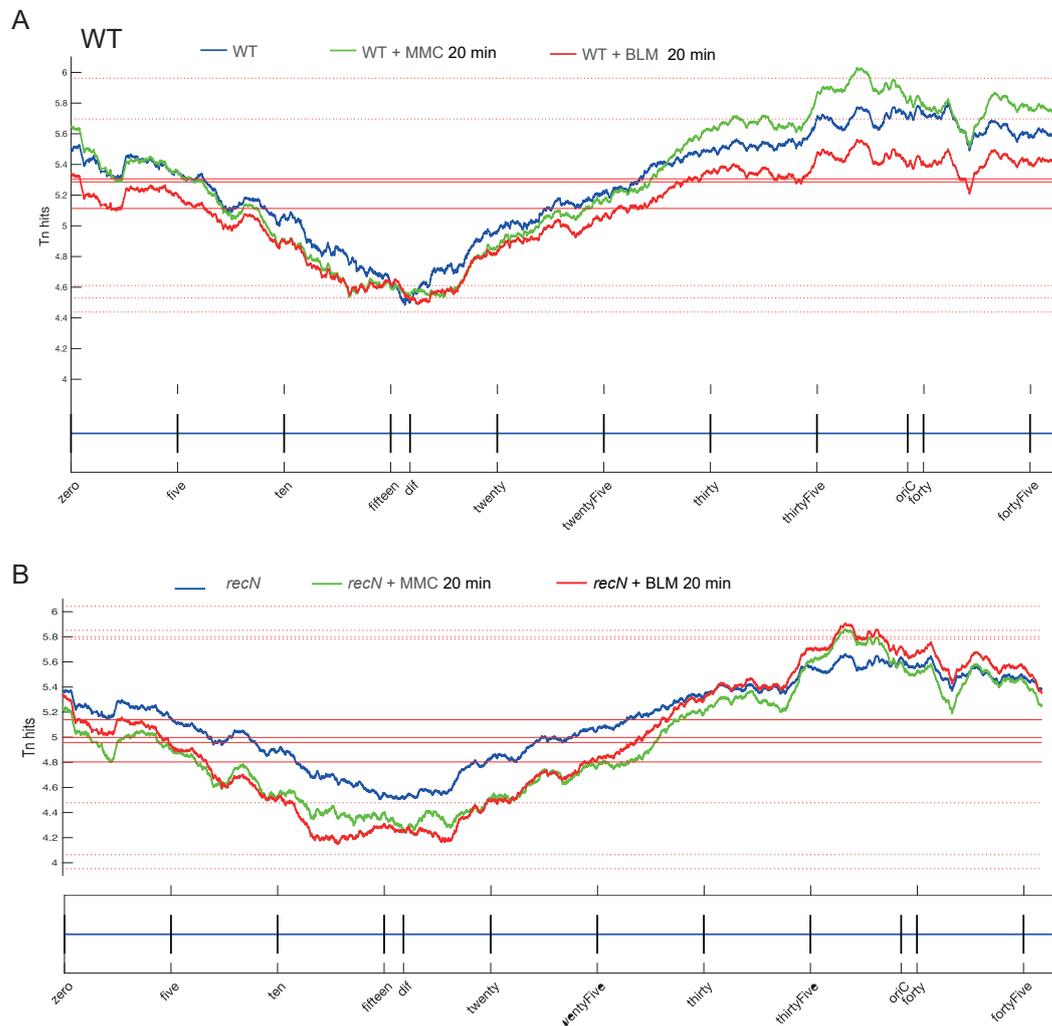




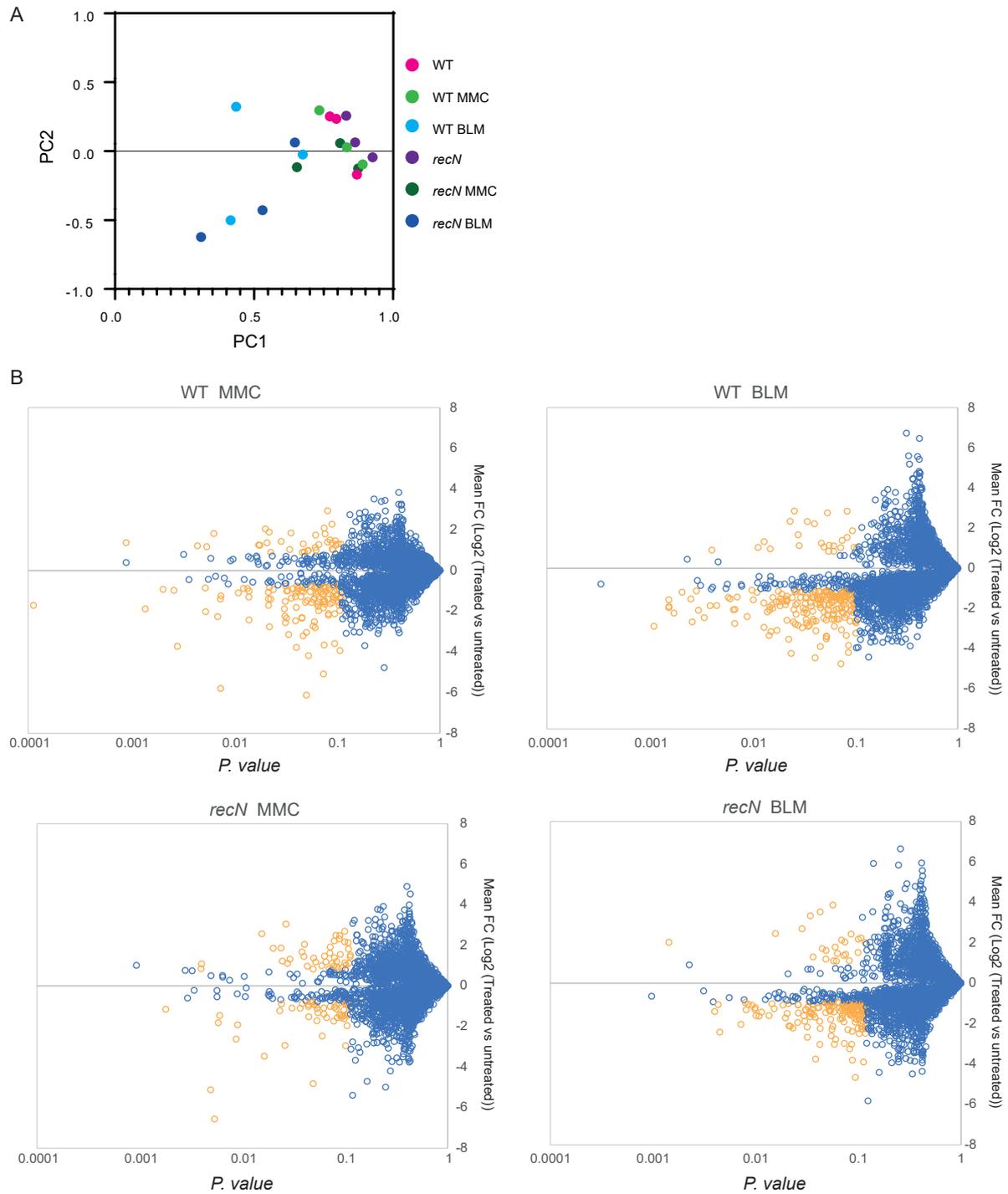
Figure_ 7. Integrated model for Genotoxic Stress Response accompanying MMC and BLM induced lesions and its impact on SCC.

A) The NER and BER pathway. **B)** The RecBCD pathway in BLM.

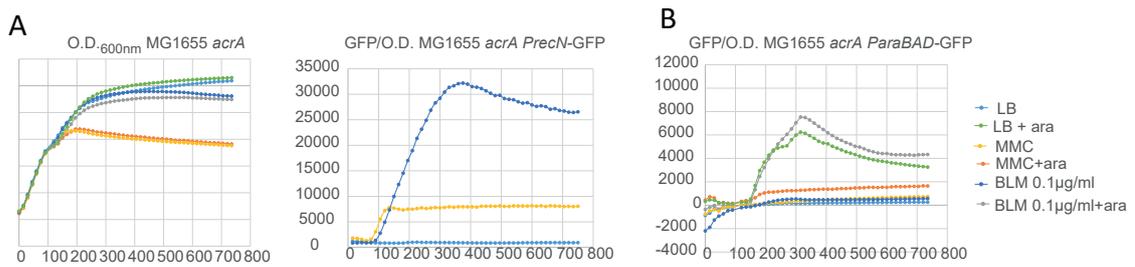
2 Legends of the supplementary figures



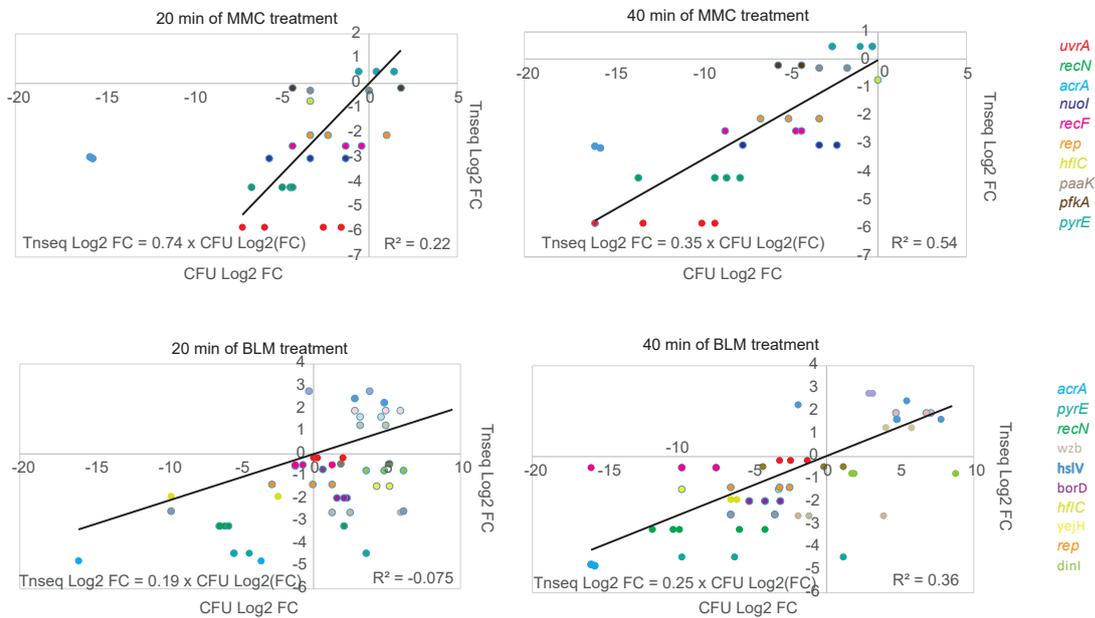
Supplementary Figure 1. Total Transposon insertion density (recombined + non recombined) in the different strains and conditions used in the HiSCI-2 analysis. This measure is a proxy for the copy number of each locus.



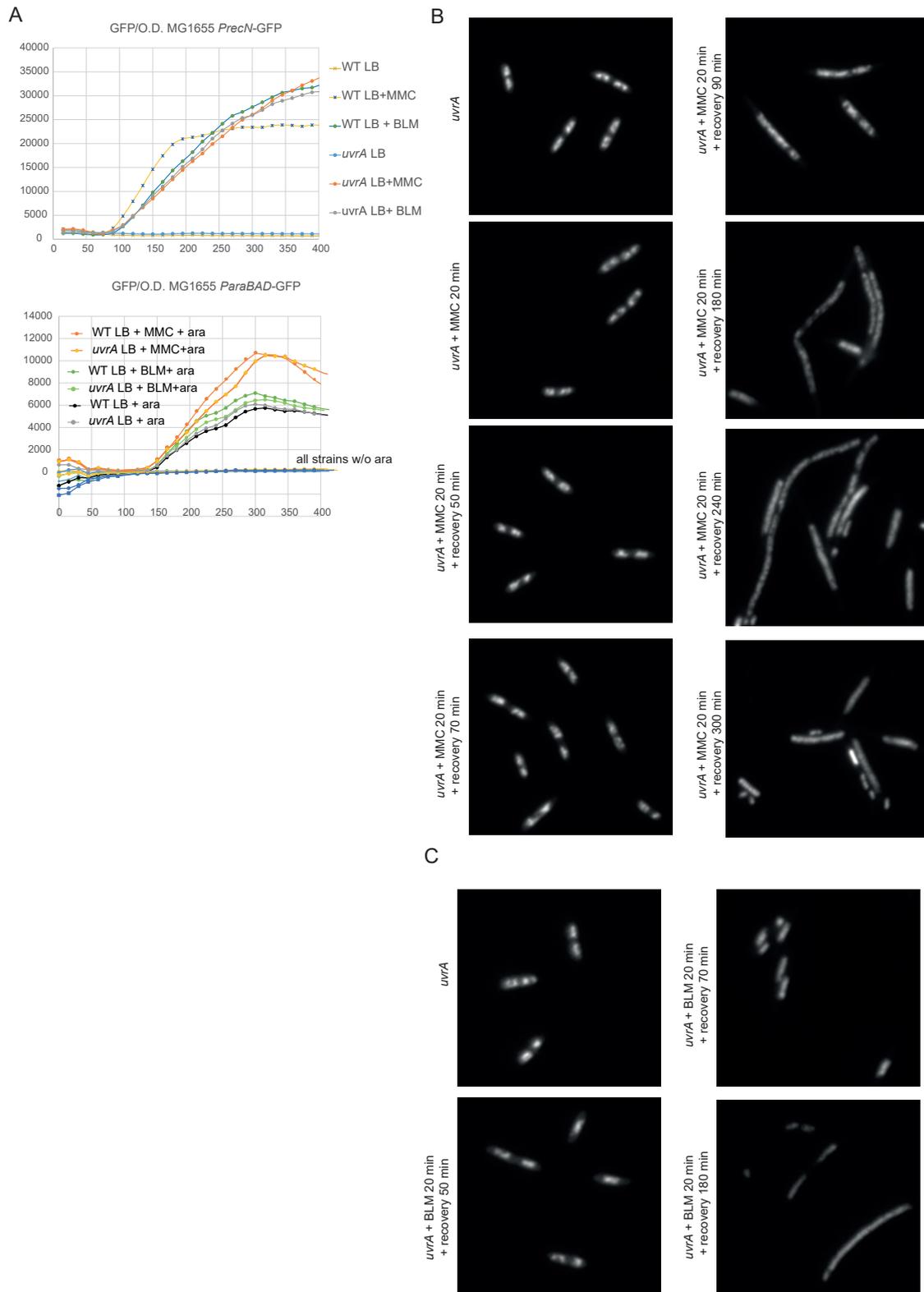
Supplementary Figure 2. **A)** Principal component analysis of TIS data Normalized Insertion Numbers (NIN) were used to compare conditions and replicates. **B)** Volcano plot of the mean Log₂ FC of TIS replicates and its P value.



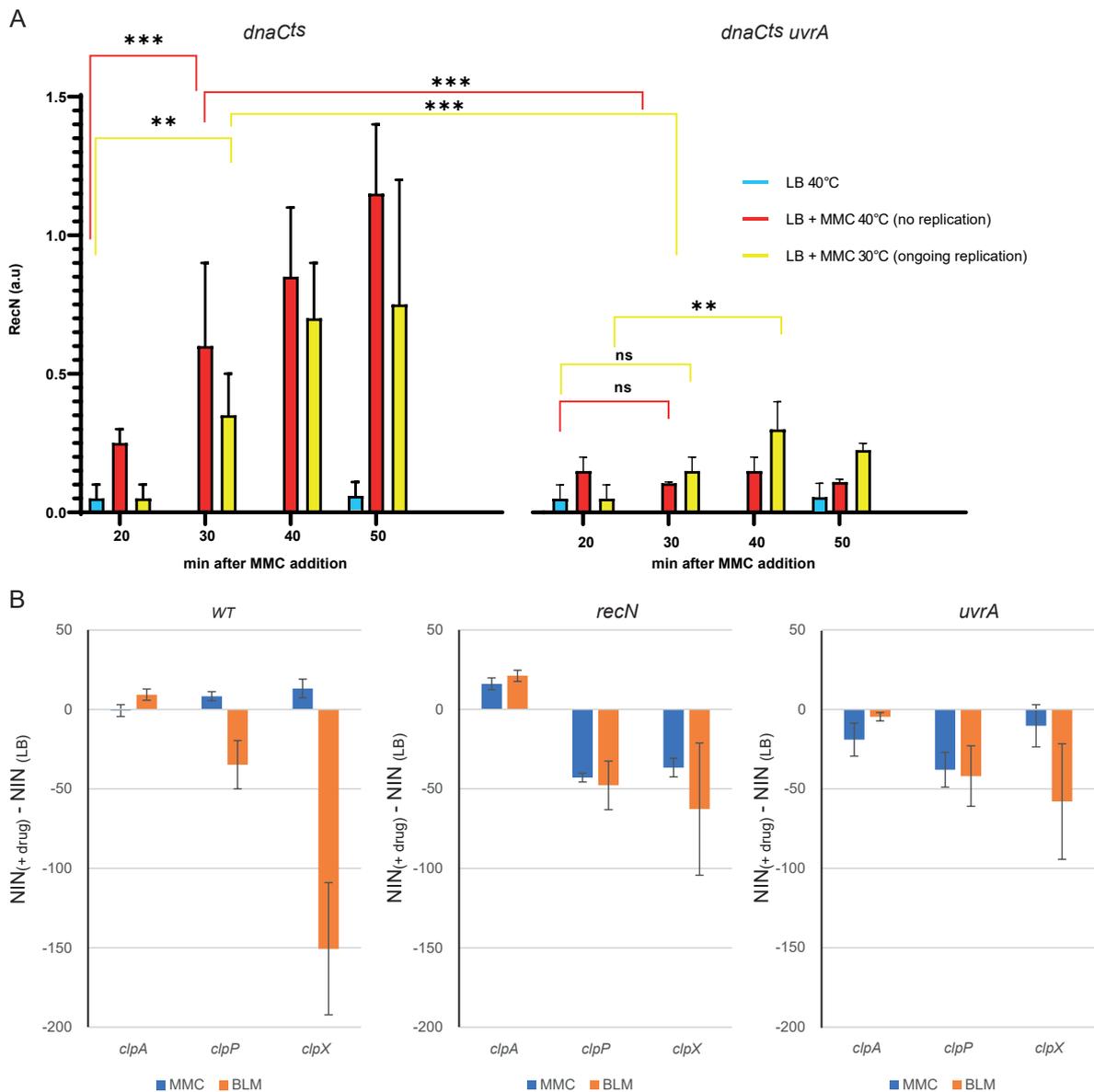
Supplementary Figure 3. A) Induction of the *recN* and *araBAD* promoter in WT and *acrA* strain in the presence of MMC or BLM. **B)** CFU analysis of the *acrA* mutant in the presence of MMC and BLM.



Supplementary Figure 4. Comparison of TIS results expressed as Log₂ FC (NIN treated / NIN untreated) and CFU expressed as Log₂ FC of the number of colonies in the treated and untreated conditions.



Supplementary Figure 5. A) Induction of the *recN* and *araBAD* promoter in WT and *uvrA* strain in the presence of MMC or BLM. **B)** Imaging of the nucleoid of *uvrA* mutant treated with MMC for 20 min, washed and allowed for a 5h recovery. **C)** Imaging of the nucleoid of *uvrA* mutant treated with BLM for 20 min, washed and allowed for a 3h recovery.



Supplementary Figure 6. A) RecN production measured by western blot in replicating and non-replicating WT and *uvrA* mutant cells. Initiation of replication of *dnaCts* cells was blocked for 90 min at 40°C before addition of MMC. **B)** TIS results for the *clpA*, *clpP* and *clpX* genes in the WT, *recN* and *uvrA* mutants. Data are expressed as the difference between the mean NIN in the treated condition and the mean NIN in the untreated conditions.

Supplementary Table 1

N° Espeli lab collection	Strain	Genotype	Antibiotic resistance	Reference
1	MG1655	<i>E. coli</i> K12		Espeli
2	MG1656	<i>E. coli</i> K12 Δ lacMlul		Espeli
9	MG1655	DnaC ^{T5}	Tet	Espeli
290	MG1655	Δ recN::Cam Humcherry::Kan	Cam Kan	Espeli
420	MG1655	RecA-Mcherry aidbT1	Cam	Espeli
427	MG1655	aidBT1 HU-mcherry	Amp Kan	Espeli
480	MG1655	aidbLacLox		Espeli
486	MG1655	Δ recN		Espeli
543	MG1655	aidbLacLox		Espeli
778	MG1655	Δ sfia Δ lexA51		Espeli
808	MG1655	Δ clpX		Espeli
810	MG1655	Δ clpXP::Cam	Cam	Espeli
1184	MG1655 MG1655	MG1655 RP4-2-Tet::[Δ Mu1::aac(3)IV- Δ aphA- Δ nic35- Δ Mu2::zeo] Δ dapA::(erm-pir) Δ recA	Cam Kan Amp	Espeli
1629	MG1655	Δ uvrA::Cam (JJC 2044)	Cam	This work
1630	MG1655	Δ uvrB::Cam (JJC 2045)	Cam	This work
1631	MG1655	Δ uvrC::Tet (CAG 12156)	Tet	This work
1632	MG1655	Δ radA::Kan (JJC 2162)	Kan	This work
1633	MG1655	Δ recN Δ uvrA::Cam (JJC 2044)	Cam	This work
1634	MG1655	Δ recN Δ uvrB::Cam (JJC 2045)	Cam	This work
1635	MG1655	Δ recN Δ uvrC::Tet (CAG 12156)	Tet	This work
1636	MG1655	Δ recN Δ radA::Kan (JJC2162)	Kan	This work
1637	MG1655	aidBlacloxP Δ uvrA::Cam (JJC 2044)	Cam Kan	This work
1640	MG1655	aidBlacloxP Δ radA::Kan (JJC 2162)	Kan	This work
1641	MG1655	aidBlacloxP Δ recN Δ uvrA::Cam (JJC 2044)	Cam	This work
1644	MG1655	aidBlacloxP Δ recN Δ radA::Kan (JJC 2162)	Kan	This work
1776	MG1655	LexA ind- Tet Δ recN::Cam	Tet Cam	This work
1779	MG1655	RecN 3XF-E1	Cam	This work
1780	MG1655	DnaC ^{T5} RecN 3XF-E1	Cam Tet	This work
1783	MG1655	Cre	Amp	This work
1811	MG1655	RecN-3X Flag E1 (FRT)		This work
1813	MG1655	Δ uvrA::Cam radA::Kan	Cam Kan	This work
1815	MG1655	Δ recN Δ radA::Kan	Kan	This work
1842	MG1655	DnaC ^{T5} RecN EXF-E1	Cam Tet	This work
1843	MG1655	RecN-3XF-E1-NM		This work

Article

1969	MG1655	(F- lambda- ilvG- rfb-50 rph-1, DnaC ^{TS} ::Tc), RecN-3XF-E1-	Tet	This work
2058	MG1655	<i>ori3 lacloxP ΔsfiA/sulA :: Kan</i>	Kan Cam	This work
2060	MG1655	<i>ΔlexA51::Cam</i> (de n°778)	Cam	This work
2220	MG1655	<i>Δphr::Cam</i>	Cam	This work
2224	MG1655	<i>ΔrmuC ::Cam</i>	Cam	This work
2226	MG1655	<i>ΔrecX::Cam</i>	Cam	This work
2259	DH5Alpha	pKO3 + LacZ 30°C (exprime LacZ)	Cam	This work
2318	MG1655	<i>ΔclpXP</i>	Cam	This work
2358	MG1655	<i>lacZ::(Cre (frt)</i>	Cam	Yoshi
2360	MG1655	<i>ΔrecN LacZ:: Cre</i>	Cam	This work
2361	MG1655	RecN-3XF <i>lacZ:: Cre (frt) :: Cam :: frt</i>	Cam	This work
2362	MG1655	<i>ΔuvrA::Cam LacZ::Cre</i>	Cam	This work
2396	MG1655	<i>ΔrecN</i>	Tet	This work
2397	MG1655	<i>ΔclpX ΔuvrA</i>	Cam Kan	This work
2398	MG1655	<i>ΔclpX ΔuvrA + RecN-3XF</i>	Cam Kan	This work
2357	MG1655	<i>LacZ:: Cre frt :: CamR :: frt</i>	Cam	Yoshi
KEIO	MG1655	<i>ΔsurA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔnuoA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔdedD</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔhypA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔborD</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔdinI</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔfruK</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔnuoK</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔamiA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔrecF</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔhslU</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔhslV</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔpriA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔacrA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔyceH</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔdadX</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔydhW</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔyniA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔyjmM</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔfliQ</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔyeeD</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>Δwzb</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔyejH</i>	Kan	(Baba et al. 2006)

KEIO	MG1655	<i>ΔnuoI</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔyfcJ</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔpyrE</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>Δrep</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔpfkA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔhflK</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔhflC</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔpurA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔyceK</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔpaaK</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔybfE</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔsurA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔnuoA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔdedD</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔhypA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔborD</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>Δdini</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔfruK</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔnuoK</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔamiA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔrecF</i>	Kan	(Baba et al. 2006)

Supplementary Table 2

Name	Resistance	References
psc-189 DMF-Mariner	Kan + DAP	(Chiang and Rubin 2002)
pGBKD 3-2	Cam	(Lesterlin et al. 2012)
pCre	Cam	(Lesterlin et al. 2012)
pcgcGi	Amp	Espeli
pRecN_GFP	Spec	Espeli
p3xFLAG [®] -CMV	Amp	https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sigma/ogs628
pCP20	Amp Cam	(Cherepanov and Wackernagel 1995)

3 Supplementary methods

Strains and plasmids. All strain and plasmids used in this study are described in Supplementary table 1. All strains are derived from wild-type MG1655 or MG1656 (Δ lac MIuI). Strains constructions were done by either P1 transduction or Lambda Red technique gene replacement.

Media. Most of the experiment were performed in LB (1 % de bacto-typtone, 0.5 % yeast extract, 1 % de NaCl, pH 7.5) or on LB-agar (LB + 1.5 % de bacto-agar). Some were realized in minimum media A (MMA : 1x (0.26 M KH_2PO_4 , 0.06 M K_2HPO_4 0.01M tri-sodium citrate, 2 mM MgSO_4 , 0.04 M $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$) 0.2% casamino acid and 0.2% glucose.

Supplementary Table 3 : Antibiotics stocks solutions

Antibiotics	Working concentration	Siglea
Kanamycin	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Kan
Chloramphenicol	30 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Cam
2,6-Diaminopimelic acid	0.6 mM	DAP
Ampicillin	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Amp
Tetracyclin	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Tet
Rifampicin	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Rif
Spectinomycin	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Spec
L-arabinose	0.1%	Ara
Isopropyl b-D-thiogalactoside	0.1 mM	IPTG
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	X-Gal

The 3X-FLAG peptide is inserted by homologous recombination in C-terminal of RecN as describe (Vickridge et al. 2017), with a new linker between the C-ter and the Flag. 3X-FLAG is a synthetic peptide of 24 amino acids. 3X (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys). A linker sequence of 11 alanine is used to dissociate the 3X-FLAG peptide from the core protein. The vecteur matrice de la PCR pour insérer le 3X-FLAG is p3xFLAG-CMV.

Colony forming unit measurement: Overnight cultures are diluted 1/200 then incubated in LB 30°C 150rpm. At an $\text{OD}_{600\text{nm}}$: 0.2, 1-10 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ MMC or BLM was added to the culture. Cell viability was followed every 10 min for 40 min. At each time point, cells were serially diluted in LB (10^0 - 10^6) and plated on LB agar plates. Plates were incubated for 16h at 37°C, and colonies were counted.

SOS response expression essay: An overnight culture of strains containing the plasmid pRecN_GFP or pcgcGi was diluted 1/200 in LB, then growth DO_{600nm} : 0.1 at 37°C and 250µl were deposited per well, in a 96 well plate (BD Falcon 96 Flat Black) with a wide humidity cassette, without cover. At DO_{600nm} : 0.2 BLM or MMC was added at concentrations of 5µg/ml or 1µg/ml respectively, with 0.1% arabinos when required. Data acquisition was performed at TECAN-SPARK at 37°C, under "double orbital" shaking 72rpm amplitude 4mm.

Western Blotting : Protein's extraction was performed on *E. coli* cell culture. 1 ml of cell in exponential phasis in LB, until (DO_{600nm} : 0.3), was centrifuged 3 min 6 000 x *g*. The pellet was resuspended in 100 µl (Trizma 20 mM pH8, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, for 50ml mix with 1 tablet « Complete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail ROCHE » (MERCK), and 1µl de « Ready-Lyse™ Lysozyme » solution (MERCK). The cells were lysed, and DNA fragmented by sonication Bioruptor Pro Diagenode 15 cycles (30 sec ON and 30 sec OFF 4°C max intensity). Then centrifuged 15 min 15 000 x *g* 4°C. 100µl of supernatant is collected and mixed in 100µl of buffer Laemmli 2X, then incubated 10 min 95°C. Electrophoresis samples were deposited in a denaturing polyacrylamide gel with gradient 4-15%, ou 7,5% « Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast Gels » (BIO-RAD). The migration is done in buffer TGS [Tris-HCl 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1 pH8] à 150V 2h. Semi-dry transfer on membrane Polyvynil Difluoride (Trans-Blot Turbo Mini 0.2 µm PVDF Transfer Packs #1704156) with Trans-Blot® Turbo™ protocol 1.5 mm GEL 10 min. **Antibody hybridizations** were performed in TBS-Tween-20 (0.1%), with skimmed milk (10%) 1h at 150 rpm. Primary antibody diluted 1/1 000^e was added and incubated 4° On night. The membrane was rinsed 3 times for 10 min at RT with TBST at 150 rpm. Then it was brought into contact with the secondary antibody at 1/5 000^{eme}. The anti-RNA-pol Beta antibody coupled to the HRP enzyme is added at the same time (« Direct-Blot HRP anti-*E. coli* RNA Polymerase beta » de OZYME) 1/20 000^{eme} RT 1h. A final series of 3 washes identical to the previous one is carried out. **Quantification revelation.** The revelation is done in chemiluminescence ECL (SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate de ThermoSCCentific) with an imaging system FUSION FX (« High Sensitivity », aperture 1.24). Software « Bio-1D software ». The results are expressed as the ratio of the amount of RecN to the amount of RNA polymerase Beta

Tn-Seq (TIS) : Library production. Tn-Seq was performed as described (Yamaichi and Dorr 2017) by conjugation from *E. coli* SM10 MFD_{pir} carrying pSC189, with in *E. coli* MG1655 isogenic strain. More than 1 million independent clones, corresponding to 3 independent conjugation reaction, were plated on LBA supplemented with Kanamycin and DAP when required, overnight at 30°C to get isolated colonies with transposon inserted.

Tn-Seq experiment. Next, the day after, all colonies from the dishes were recovered by scraping them and mixing in 30ml LB. OD was adjusted to OD_{600nm} : 0.03 in 45ml LB at 30°C 150rpm and grown to OD_{600nm} : 0.15. The genotoxic agent (MMC 5 µg/ml or BLM 1µg/ml) was

added for 20 min. To remove the toxic agent two washes were performed. Once the washes were completed by centrifugation and replacing the supernatant with fresh medium, the cells were spread to target is to recover 500k and 1000k colonies with isolated colonies plated ON 30°C LBA. Construction of the sequencing library was performed as described in the protocol (Yamaichi and Dorr 2017). **Tn-Seq Analysis procedure.** To validate the reproducibility, biological triplicate was performed in MMC and a biological duplicate in Bleomycin. The software used is "Tn-Seq explorer" V1.5b with the parameters: --very-sensitive-local. All the sequences located on the genome are counted and conserved up to 5 000 insertions maximum, beyond that we consider that it is a non-specific amplification by PCR and these values are eliminated. Reference genome: *E. coli* U00096.genes genome. We count all insertions normalized by TA. The insertions of the transposon, located in the gene at -5% and the end of the gene -20% were eliminated. The parameter for scanning the genome is a window length of 1000 bp per 5 base steps. We normalized the value of the number of insertions of each gene by the total number of insertions conserved in the condition. All genes with 0 to 2 insertions in the WT_NT reference condition are considered essential or non-informative genes. Then the ratio is made between condition 1 and condition 2.

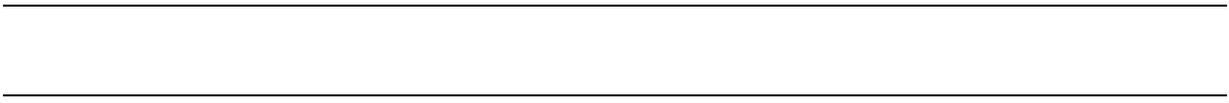
Hi-SC2 : Hi-SC2 was performed in a similar way to (Espinosa, Paly, and Barre 2020). The *loxP* sites were introduced by conjugation and transposition. The conjugation were performed between *E. coli* β -2163 pSWT23 (Demarre et al. 2005)(van Opijnen, Bodi, and Camilli 2009) and *E. coli* MG1655, this last one has the recombination system Cre, previously introduced on the genome by recombination thanks to the « *lambda-red* », to *lacZ* site. The *cre* gene has been placed under the control of P_{BAD} promoter. To ensure that there is no spontaneous recombination due to leakage of promoter expression, *lacZ* gene promoter was inserted with a reversed orientation (invP_{lac}) at the end of *cre* to be able to suppress it. The activation of invP_{lac} inhibits the transcription leakage of P_{BAD} in absence of arabinose. IPTG was added at different stages of culture and preculture. The transposon is used here as a vector to introduce the *loxP* sites. They are integrated as a cassette of two *loxP* sites, oriented in the same direction, and separated by 21bp to ensure that excision occurs only after replication. **Preparation of the transposition bank** is done in the same way as the tn-seq protocol in the presence of DAP (0.6 mM concentration) for the donor strain β -2163 and the recipient strain possessing Cre, in the presence of 0.1 mM IPTG. Once the library is made, it is frozen at -80°C with 50% glycerol. **Hi-SC2 essay.** Aliquots of the transposition library were placed on ice for thawing. Cells were grown to exponential growth phase (OD₆₀₀: 0.2) from 10⁸ cells diluted in 100ml LB with IPTG (initial OD₆₀₀ : 0.05). Then 1ml of culture is centrifuged and transferred into 40ml of new culture medium without IPTG at 30°C 180 rpm. After 90 min, when OD₆₀₀: 0.1 is reached (i.e. about 1.10⁸ cells), the genotoxic agent is added for 20 min. Then, three washes in LB at RT were performed by successive centrifugations at 6 000 x *g* for 3 minutes. Then 0.1% arabinose is added for 60 minutes with or without recovery time. 10ml are pelleted, then frozen without the supernatant in liquid nitrogen and stored at -20°C, before the extraction of the gDNA. Construction of the sequencing library was performed as described in

the protocol (Espinosa, Yamaichi, and Barre 2020). Sequencing was performed on a NextSeq 500 (Illumina) in 2 x 75 bp "Paired-end sequencing", with a total of 300-400 M reads per flow cell. We aim to obtain 20 M sequences for each sample.

Microscopy: An overnight culture was diluted 1/200 in LB or MM A supplemented with 0.2% casamino acids and 0.2% glucose. The cells were grown to an OD_{600nm} : 0.2 at 37 °C. We observe the bacteria on 1% agarose melted in GTE. The images were taken on Zeiss Axio. Observed with an objective 63X PL-APO, NA 1.40. The acquisition was done with ZEN software and the processing and analysis of the images with Fiji software and its application MicrobeJ. The images are processed on MicrobeJ for the detection of bacteria and nucleoids. For each experiment a minimum of 100 cells is required. Bacteria detection is done on the phase contrast image. The model used is Medial Axis (Length : Min 2 ; width : Max 1.1) ; and in the Maxima tab, the model used is Foci (Tolerance : 720 ; Z-score : 50). MicrobeJ is used to make demographics of fluorescence profiles as a function of cell size. We used Fiji to quantify the fluorescence of Dapi in each bacterium, the threshold of fluorescence was fixed at 4000 A.U., i.e. the minimum of fluorescence for all the studied strains. The fluorescence of the nucleoid or the whole cell is measured.

Supplementary references

- Abremski, K., and R. Hoess. 1985. 'Phage P1 Cre-loxP site-specific recombination. Effects of DNA supercoiling on catenation and knotting of recombinant products', *J Mol Biol*, 184: 211-20.
- Cherepanov, Peter P., and Wilfried Wackernagel. 1995. 'Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant', *Gene*, 158: 9-14.
- Diederich, Ludger, Lene Juel Rasmussen, and Walter Messer. 1992. 'New cloning vectors for integration into the λ attachment site attB of the *Escherichia coli* chromosome', *Plasmid*, 28: 14-24.
- Duigou, S., and F. Boccard. 2017. 'Long range chromosome organization in *Escherichia coli*: The position of the replication origin defines the non-structured regions and the Right and Left macrodomains', *PLoS Genet*, 13: e1006758.
- Espinosa, E., E. Paly, and F. X. Barre. 2020. 'High-Resolution Whole-Genome Analysis of Sister-Chromatid Contacts', *Mol Cell*, 79: 857-69 e3.
- Lesterlin, C., E. Gigant, F. Boccard, and O. Espeli lab stock. 2012. 'Sister chromatid interactions in bacteria revealed by a site-specific recombination assay', *EMBO J*, 31: 3468-79.
- Nielsen, H. J., Y. Li, B. Youngren, F. G. Hansen, and S. Austin. 2006. 'Progressive segregation of the *Escherichia coli* chromosome', *Mol Microbiol*, 61: 383-93.
- Rossignol, M., L. Moulin, and F. Boccard. 2002. 'Phage HK022-based integrative vectors for the insertion of genes in the chromosome of multiply marked *Escherichia coli* strains', *FEMS Microbiol Lett*, 213: 45-9.
- van Opijnen, T., K. L. Bodi, and A. Camilli. 2009. 'Tn-seq: high-throughput parallel sequencing for fitness and genetic interaction studies in microorganisms', *Nat Methods*, 6: 767-72.
- Yamaichi, Y., and T. Dorr. 2017. 'Transposon Insertion Site Sequencing for Synthetic Lethal Screening', *Methods Mol Biol*, 1624: 39-49.



VIII. Discussion

1 Une multitude de voies de réparation impliquées dans la prise en charge les lésions à la MMC et la BLM

Lorsque l'ADN est endommagé, le répresseur transcriptionnel LexA est détruit, plus de 40 gènes sont induits par le régulon SOS (Brent and Ptashne 1981; Fernandez De Henestrosa et al. 2000; Courcelle et al. 2001). LexA induit un large éventail de fonctions cellulaires qui sont essentielles pour la survie et l'adaptation lorsque les bactéries subissent des conditions de stress, notamment la réparation de l'ADN, la mutagenèse, le transfert horizontal de gènes, la croissance par filamentation et l'induction de toxines bactériennes pour certaines souches sauvages, ainsi que des systèmes toxine-antitoxine, des facteurs de virulence et des prophages. La fonction de plus d'une dizaine de gènes induits durant la réponse SOS reste encore inconnue (Simmons et al. 2008). A titre d'exemple, plus de 1 000 gènes d'*E. coli* sont régulés en réponse à l'exposition à la MMC (Simmons et al. 2008), nous confortant dans une approche globale. La réponse au stress génotoxique (RGS) lié à ces antibiotiques chez *E. coli* et d'autres bactéries, reste imparfaitement caractérisée.

Pour identifier des voies connexes associées et des partenaires potentiels de RecN, j'ai effectué un criblage par mutagenèse et transposition, suivi d'une analyse de séquençage : le TIS. Le TIS a été réalisé sur trois fonds génétiques différents (WT, *recN* et *uvrA*), avec la BLM ou la MMC. Cette stratégie nous a permis d'avoir une vision globale et d'aboutir à une proposition de modèle qui intègre les changements d'équilibres des réponses de survie, selon le contexte (le modèle en question est présenté à la fin de l'article **Figure_7. Integrated model for Genotoxic Stress Response accompanying MMC and BLM induced lesions and its impact on SCC.**

La BLM présente un large spectre d'altérations de la cellule. En présence de cofacteurs tels que (Fe^{2+} et O_2), la BLM induit un puissant stress oxydatif produisant des CDB sur l'ADN, clivant les ARNm et les ARNt (Magliozzo, Peisach, and Ciriolo 1989; Holmes et al. 1997; Abraham et al. 2003). A l'inverse, dans les cas de sous oxygénation, elle induit préférentiellement des CSB et des sites abasiques. Nos conditions expérimentales (milieux riches avec une agitation de 150 rpm) favorisent la formation de CDB, la survie dépend donc

de la recombinaison homologue (Burger, Peisach, and Horwitz 1981; Umezawa et al. 1966; Mori et al. 2008). La MMC quant à elle est métabolisée dans la cellule en MMC hydroquinone, un agent alkylant bifonctionnel qui génère des adduits entre deux brins d'ADN opposés. Dans les cellules, l'ADN exposé à la MMC est connu pour être traité par le NER (Iyer and Szybalski 1963; Szybalski and Iyer 1964; Boyce and Howard-Flanders 1964).

1.1 Les voies de réparation en MMC

Après lésions à la MMC, la survie des souches WT dépendait de différentes voies qui coopèrent dans la GSR : le NER, le BER et le dégagement de la fourche de réplication. En absence de RecN, les gènes du NER, ainsi que : RecF, RecR, RecJ, Nfo, Rep, ExoX et RadA étaient encore nécessaires, ce qui suggère la présence de différents groupes épistatiques dans la GSR voir

Figure 39. Nous avons confirmé par CFU que RecN et RecF, Rep ou RadA appartiennent à des groupes épistatiques différents.

Nous avons observé quelques différences intéressantes entre les deux souches. Tout d'abord, l'inactivation de *recG* était beaucoup moins néfaste dans la souche *recN* que dans la WT. Ensuite, l'inactivation de *nth*, était préjudiciable dans la souche WT mais légèrement bénéfique dans la souche *recN*. De façon concomitante, la pression sélective était beaucoup plus élevée sur *xthA* et *nei* lorsque RecN était absent. XthA et Nei catalysent respectivement la première glycosylase et la seconde endonucléase AP.

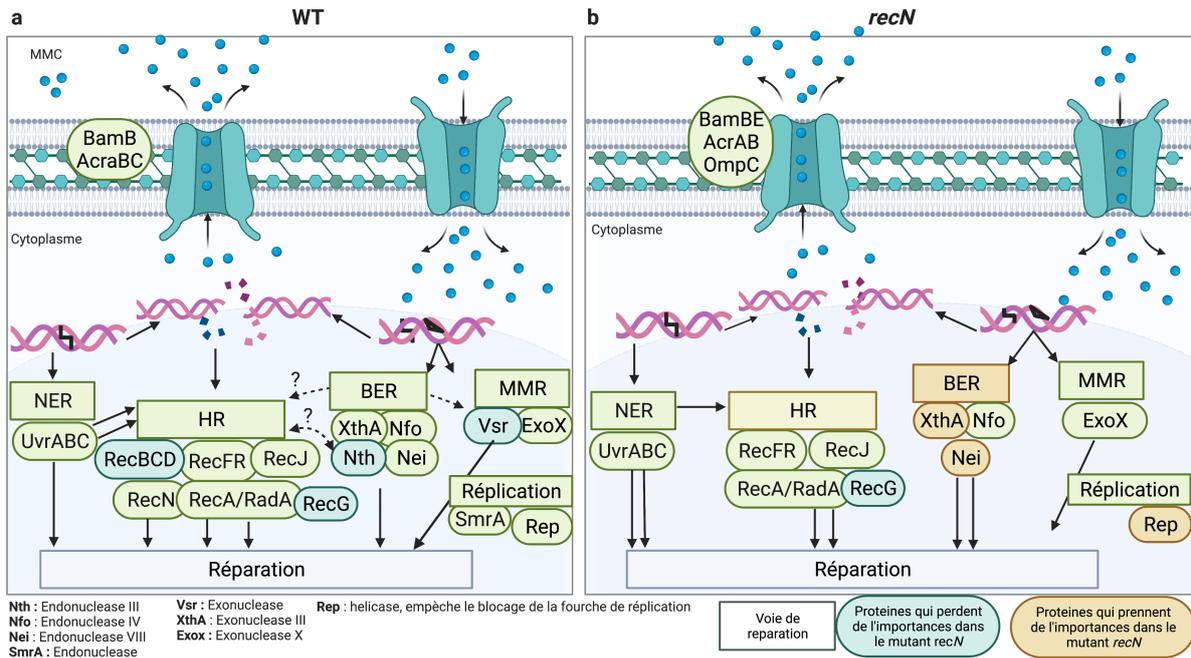


Figure 39 Représentation des résultats du TIS en MMC

Dans l'encadré de gauche la souche WT, dans l'encadré de droite la souche *recN*. Dans les rectangles les voies impliquées, dans les ovales les protéines impliquées. Les flèches caractérisent les flux. La couleur des fonds des ovales évoque l'importance de la représentativité selon le contexte génétique bleu-vert signifie dispensable pour le mutant *recN* par rapport au WT, jaune aussi important, ocre signifie plus important pour le mutant *recN* par rapport au WT. Les flèches en pointillés représentent des interdépendances possibles révélées par le TIS. **a.** Après lésions à la MMC, la survie des souches WT dépendait de différentes voies qui coopèrent dans la GSR accompagnant les lésions induites par la MMC : le NER (UvrABC), la RH (RecF, RecR, RecG, RecN, RadA et RecJ), le BER (Nth et Nfo), et le dégageur de la fourche de réplication (*via* Rep). En absence de RecN les gènes suivants étaient encore nécessaires : UvrABC, RecF, RecR, RecJ, Nfo, Rep, ExoX et RadA. **b.** En absence de RecN les gènes : UvrABC, RecF, RecR, RecJ, Nfo, Rep, ExoX et RadA, restaient nécessaires.

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que la survie à la toxicité de la MMC nécessite un traitement par NER, HR et BER.

L'absence de RecN augmente la pression sur le BER (XthA, Nei) et le traitement de la réplication est bloqué (Rep) alors qu'elle pourrait faire passer la recombinaison homologue d'une voie dépendante de RecG à une voie dépendante de RecF, RecR, RecJ et RadA. En absence de RecN, les intermédiaires BER produits par Endo III pourraient devenir toxiques si Endo VI ne les traite pas.

1.2 Les voies de réparation en BLM

En BLM dans la souche WT, le TIS a révélé le rôle de protéines contribuent aux voies HR, BER et de redémarrage de la réplication. Les lésions causées par les UV entraînent chez les plantes d'*Arabidopsis* un changement de l'implication des voies de réparation lors d'un défaut dans la voie du NER; suggérant également chez les eucaryotes l'existence d'interconnexions entre les deux principales voies de réparation des dommages à l'ADN induits par les UV et la réparation par HR. De plus, les cellules soumises à la bléomycine ou aux UV-C subissent une compaction de leur chromosome (Molinier et al. 2005).

Dans nos résultats, nous pouvons les diviser en deux groupes en fonction de leur importance en l'absence de RecN. Lorsque RecN est absente, *radA*, *sbmC*, *sbcB*, *endA* et *nth* perdent leur importance, ce qui suggère que leur activité est requise dans une ou plusieurs voies impliquant RecN. La présence de RadA dans ce groupe suggère que les lésions induites par BLM sont traitées par une voie HR qui devient dispensable ou délétère lorsque RecN est absente voir **Figure 40**.

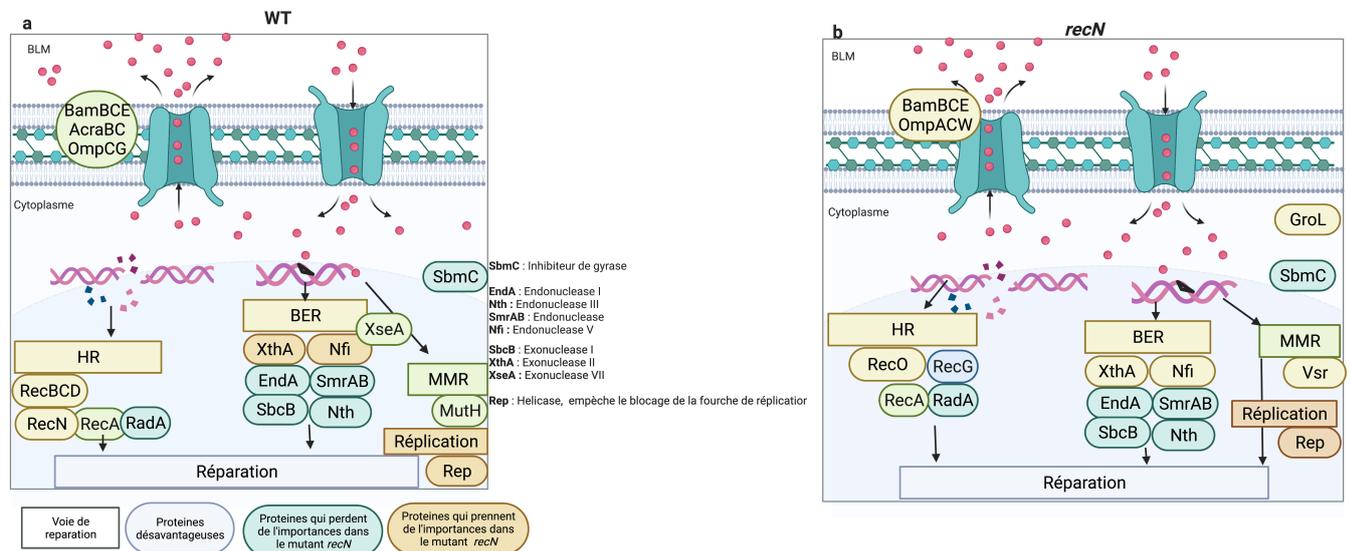


Figure 40 Représentation des résultats du TIS en BLM

Le TIS révèle pour la souche WT en BLM, le rôle de SmrAB, EndA, RadA, SbcB (*xonA*), XthA, Nfi et SbmC. Dans les rectangles les voies impliquées, dans les ovales les protéines impliquées. Les flèches caractérisent les flux. La couleur des fonds des ovales évoque l'importance de la représentativité selon le contexte génétique, bleu-vert signifie dispensable pour *recN* par rapport au WT, jaune aussi important, ocre signifie plus important pour le mutant *recN* par rapport au WT. **a.** Souche WT BLM **b.** souche *recN* BLM.

La présence de SbcB et Nth dans le groupe dépendant de RecN, et de XthA et Nfi dans le groupe indépendant de RecN, suggère que les lésions induites par BLM nécessitent également un traitement par la voie BER. De plus, la dépendance vis-à-vis de l'hélicase Rep qui empêche le blocage de la fourche de réplication, et les recombinaisons illégitimes qui en résulte suggère que les fourches de réplication sont fréquemment bloquées par les lésions induites par BLM en l'absence de RecN.

De manière intéressante, l'activité de RecG est apparue préjudiciable pour la survie aux lésions de BLM. Les souches mutantes dépourvues de la fonction RecG permettent une réplication stable et constitutive de l'ADN (Hong, Cadwell, and Kogoma 1995) sur la réplication de la région terminale (Rudolph et al. 2013). Il est donc possible que dans nos conditions expérimentales, la réplication stable et constitutive de l'ADN, et/ou la réplication de la région terminale, ait été bénéfique pour la survie.

Nous n'expliquons pas encore les rôles des autres gènes impliqués dans la réparation des lésions induites par la BLM : SbmC (un inhibiteur de la gyrase), EndA (Endo I, une endonucléase à la fonction mal caractérisée), XseA (exonucléase VII) et SmrA et SmrB (small mutS2-related A et B, endonucléases aux fonctions mal caractérisées également).

1.3 Chez les mutants NER, la survie à la toxicité de la MMC dépend de réponse alternative au stress génomique

Pour découvrir quelles voies génétiques restent importantes pour permettre à un petit nombre de cellules de survivre à ce traitement, nous avons appliqué TIS au mutant *uvrA*. Comme nous l'avons observé pour les souches WT et *recN*, le système d'efflux AcrAB-TolC et le complexe BAM nécessaire à son assemblage étaient essentiels à la survie. Un nouvel ensemble de gènes importants pour la survie liés au stress oxydatif étaient fortement représenté : *msrC* et *msrB*, *rsuA*, *bcp*, *fes* et *dps* **Figure 41**.

Les insertions de Mariner dans tous ces gènes sont sélectionnées positivement en présence de MMC : les enzymes impliquées dans le métabolisme et le turnover de l'ARN (*greA*, *rnhA*, *rnb*, *pnp*, *deaD*, *smrB*).

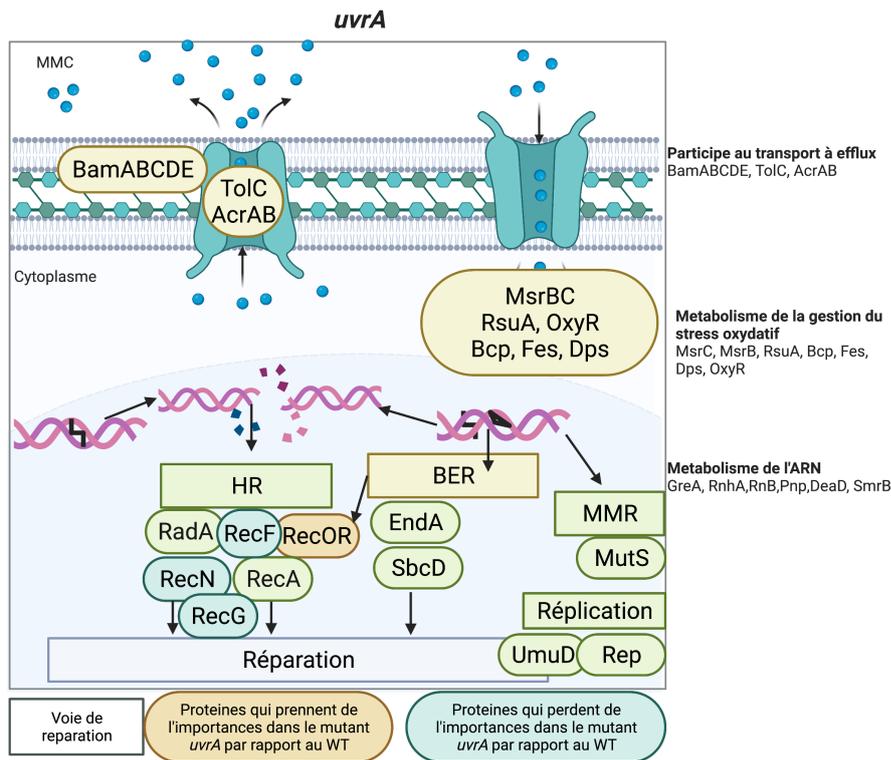


Figure 41 Voies de support à la réparation de l'ADN

Dans l'encadré de gauche la souche WT, dans l'encadré de droite la souche *recN*. Dans les rectangles les voies impliquées, dans les ovales les protéines impliquées. Les flèches caractérisent les flux. La couleur des fonds des ovales évoque l'importance de la représentativité selon le contexte génétique, bleu-vert signifie qu'elles perdent de l'importance pour *uvrA* par rapport au WT, jaune aussi important, orange signifie plus important pour le mutant *uvrA* par rapport au WT.

Ces derniers résultats montrent que seul l'efficacité de la réparation de l'ADN n'est pas suffisante pour expliquer les seuils de survie, ou expliquer comment un antibiotique peut agir. C'est sur de multiples systèmes que la cellule se repose pour gérer les stress induits par les AB.

Par exemple, l'exposition des cellules d'*E. coli* à l'hydroxyurée, un inhibiteur spécifique de l'enzyme ribonucléotide réductase, diminue la concentration intracellulaire de dNTPs, ce qui entraîne une pause de la fourche de réplication et l'induction de SOS (Barbé, Villaverde, and Guerrero 1987). À la suite de l'exposition à l'hydroxyurée, l'induction de RecA, Sula, est indépendante de RecBC. Bien que RecA nécessite de l'ATP pour le clivage de LexA, les réserves d'ATP intracellulaires ne sont pas un facteur limitant pour l'induction de SOS (Villaverde and Barbé 1992). La survie pendant la privation de nucléotides est améliorée par les polymérases

de la famille Y UmuC et DinB régulées par SOS (Godoy et al. 2006), probablement en raison de leur affinité plus élevée pour les dNTP par rapport à la Pol III.

1.4 L'implication du NER différencie la réparation des lésions induites par la MMC et la BLM

Les données TIS et CFU ont montrées que les lésions induites par MMC et BLM nécessitent à la fois les voies HR et BER, RecN jouant un rôle important dans le flux ou le résultat de ces processus.

La voie du NER pourrait produire des cassures doubles brins suite aux traitements des adduites, ou au passage de la fourche de réplication s'écrasant contre les bases fusionnées. Bien qu'un des modèles présente une double incision par le NER, intercalé par le passage de l'ADN polymérase trans-lésionnel **Figure 42**. Nous proposons qu'à la suite de la première incision, ou de la seconde, l'ADNsb généré permette l'intervention de RecFOR et ainsi le chargement de RecA (Buljubasic et al. 2019). Ceci pourrait amplifier la réponse SOS et promouvoir une réparation plus efficace des adduits par RH, faisant intervenir RecN (Kisker, Kuper, and Van Houten 2013).

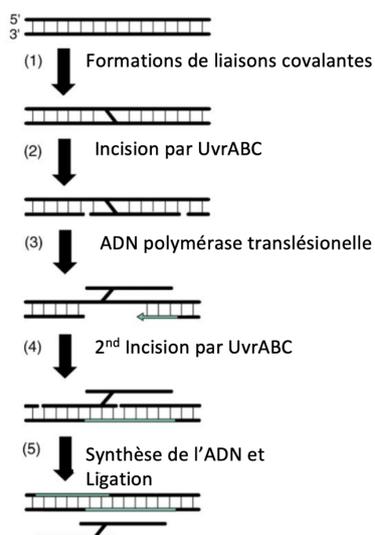


Figure 42 Voie de réparation chez *E. coli* impliquant le NER à la suite d'une ILC

1. Formations de liaisons covalantes entre deux brins d'ADN. 2. Incision par UvrABC 3. Synthèse par l'ADN polymérase translésionnelle 4. Seconde incision par UvrABC 5. Synthèse de l'ADN et ligation. Figure reprise de (Dronkert and Kanaar 2001)

Nous avons considéré que le NER pouvait donc être responsable de la dynamique différente des chromatides sœurs que nous avons observées en réponse aux lésions induites par la MMC et la BLM. Les tests Hi-SC2 et *laclox* ont montré une diminution du NER dans les mutants *uvrA* et *uvrA recN* comparable à celle du mutant *recN*. La microscopie a montré une décondensation des nucléoïdes chez le mutant *uvrA* comparable à celle du mutant *recN*. Ces observations suggèrent qu'en l'absence d'activité NER, RecN n'a aucune influence sur la dynamique des chromatides sœurs et la morphologie des nucléoïdes. Une explication possible serait qu'en l'absence de NER, la réponse SOS n'est pas induite et RecN n'est pas produit. Une autre étude sur *E. coli* soutient cette idée : en microscopie il a été observé qu'après irradiation aux UV, la formation d'un nucléoïde condensé est retardée dans la souche *recF*, et totalement absent dans une souche *recO* et *recR* (Odsbu and Skarstad 2014).

Bien que l'induction de RecN ait été légèrement réduite en présence de MMC dans le mutant *uvrA*, son accumulation en présence de MMC est restée inchangée. En revanche, après le lavage de la MMC, RecN a disparu beaucoup plus rapidement chez le mutant *uvrA* que chez le WT. Ceci nous a incité à considérer un lien entre l'activité NER et la dégradation de RecN. La stabilisation de RecN avec l'épitope 3XFlag en C-terminal a restauré la quantité de RecN dans la souche *uvrA* à un niveau comparable à celui de la souche WT. Ceci a confirmé que la stabilité de RecN est le principal facteur expliquant sa faible quantité dans la phase de récupération.

Pendant la phase de récupération suivant le traitement par la BLM, la quantité de RecN n'a pas été affectée par l'absence d'UvrA. Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que l'activité NER, plutôt qu'une interaction UvrA-RecN, est nécessaire à la stabilité de RecN. En stoppant la capacité de réplication du génome de nos souche *Dnac^{TS}*, nous avons observé que la quantité de RecN dépend directement du fonctionnement du NER, ce qui a confirmé que le NER est le principal moteur de la stabilité de RecN dans les cellules traitées par MMC.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent qu'en l'absence de NER, RecN est rapidement dégradé en condition de MMC et que sa quantité chute en dessous d'un niveau permettant les interactions entre chromatides sœurs et une réparation optimale par HR.

De façon similaire, il a été découvert chez les plantes d'*Arabidopsis* que les lésions causées par les UV entraînent un changement de l'implication des voies de réparation lors d'un défaut dans la voie du NER; suggérant également chez les eucaryotes l'existence d'interconnexions entre les deux principales voies de réparation des dommages à l'ADN induits par les UV et la réparation par HR. De plus, les cellules soumises à la bléomycine ou aux UV-C subissent également une compaction de leur chromosome (Molinier et al. 2005).

1.5 Conclusion TIS

Finalement, mon travail met en lumière le fait que la réponse au stress génotoxique implique non seulement les gènes de la réponse aux dommages de l'ADN (qui englobe la réponse SOS), mais également de nombreuses fonctions comme les pompes à efflux et leur mise en place par le complexe BAM, des régulateurs du cycle cellulaire, des effecteurs de la réponse au stress oxydant, le métabolisme respiratoire et même des éléments extracellulaires. La présence ou l'absence de RecN va déplacer les équilibres entre ces différentes voies de réparation ou de tolérance des lésions **Figure 43**.

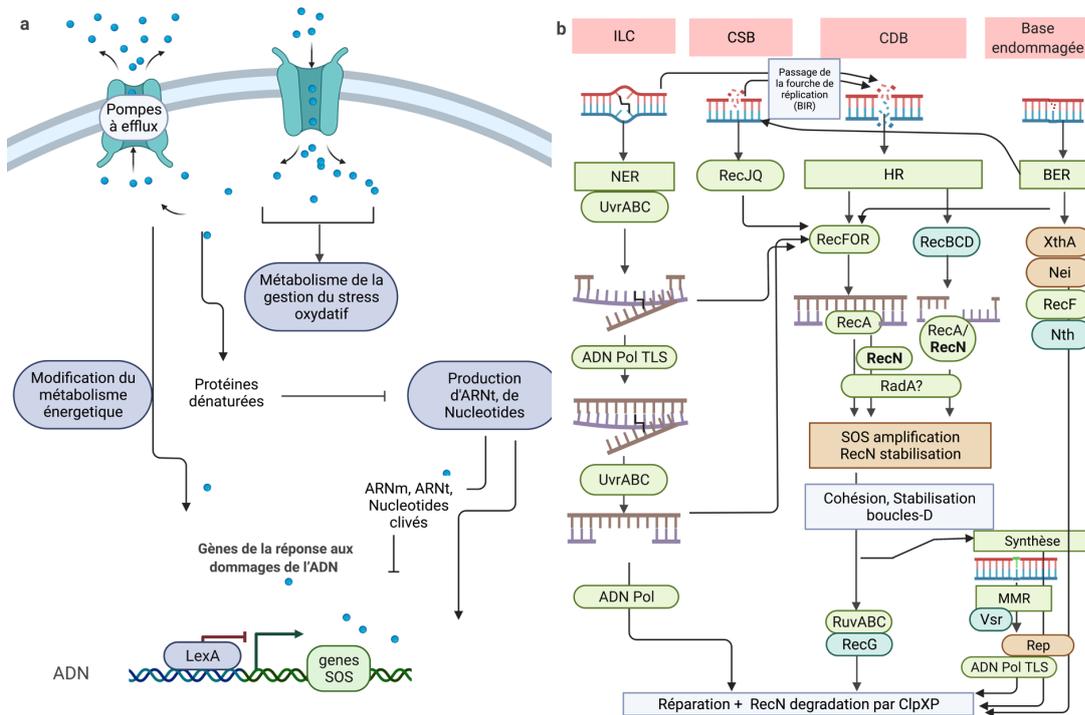


Figure 43 Schéma récapitulatif des différents systèmes interconnectés servant la survie en BLM et MMC

a. Représentation des systèmes de supports servant à la cellule pour dépasser les stress génotoxiques liés à la BLM et MMC. b. Différentes voies de réparations, et leurs interconnexions possibles, ainsi que leurs effets, permettant d'aboutir à la réparation du chromosome et à la reprise du cycle cellulaire.

Pour pouvoir extraire et structurer d'avantage les données du TIS, il serait intéressant de les coupler à un RNA-Seq dans les mêmes conditions, ainsi, on pourrait se servir des résultats de ce dernier pour filtrer les gènes exprimés dans nos conditions. Après avoir passé les données du TIS au tamis du RNA-Seq, il serait pertinent d'appliquer une analyse par Intelligence Artificiel. En effet, de plus en plus de techniques d'intelligence artificiel sont développées pour réaliser des recoupements qui permettraient d'évaluer « l'essentialité », puis sur des aspects fonctionnels du réseaux d'interaction protéine-protéine un peu à l'image du logiciel STRING (Chen, Michel, and Zhang 2022). Cette triple combinaison pourrait permettre d'obtenir des cartes de voies métaboliques liées à la survie, telles des « piliers » de la survie, et pour chaque « pilier », les regrouper selon les profils (comme le métabolisme énergétique, les pompes à efflux etc..). La dernière étape serait de comparer ces « cartes » selon les souches étudiées, afin de faire ressortir tous les partenaires actifs d'une même voie.

Cette approche est également pertinente pour étudier en médecine, le développement de médicaments antimicrobiens, antitumoraux à large échelle.

2 L'ADNsb comme substrat à la stabilisation de RecN ?

Élise avait réalisé une Co-immunoprécipitation de RecN après traitement MMC suivit d'une analyse par spectrométrie de masse. Ses résultats avaient révélé que RecN pouvait potentiellement être rattaché à UvrABC, RadA, RecA. Sachant que les SMC ont généralement des partenaires participant à leur chargement/déchargement sur l'ADN. Il nous a semblé intéressant de voir si des partenaires plausibles pouvaient réduire a eu seul la dégradation de RecN. Nous avons imaginé que RecN pouvait s'associer en C-ter à d'autres protéines et cacher son peptide signal qui lui permet d'être adressé au protéasome.

Afin de trouver quel substrat permettait d'empêcher la dégradation de la protéine RecN, j'ai réalisé des tests *in vitro* où différentes combinaisons de substrats (ADNsb circulaire, ADNdb circulaire, ADNg purifié, ADNg et avec ou sans : RecA, UvrA, UvrB, UvrC) étaient utilisées pour empêcher la dégradation de RecN. Le milieu de réaction était composé d'une solution avec de l'ATP, d'un extrait brut de protéines d'*E. coli* en phase exponentielle de croissance. L'extrait brut conservait les protéases actives. L'ADNsb et RecA ont permis d'observer une tendance à ralentir la dégradation de RecN sans être significatif. J'en conclus

que soit d'autres partenaires n'ont pas été démasqués, soit c'est l'accumulation de RecN sur l'ADN chromosomique avec toutes les protéines associées au nucléoïde qui permet son maintien. Il se peut également que la vitesse de diffusion de RecN sur l'ADN, empêche la capture de RecN, et que c'est uniquement quand elle est immobile qu'elle va pouvoir être dégradée.

3 RecN module-t-il l'expression de certains gènes ?

En qualité de SMC, un des rôles que pourrait avoir RecN serait la régulation de certains gènes. En effet chez les vertébrés, il a été démontré que la condensine I et la condensine II s'associent à des séquences « enhancers » permettant de suractiver certains promoteurs et semblent contribuer à la stabilité de la boucle d'ADN amplificateur-promoteur (Downen and Young 2014). Chez les mouches, on a découvert que la cohésine Nipped-B, contribuait à l'activation de gènes et il a été démontré que la perturbation de la cohésine entraîne des déficits du développement (Downen and Young 2014). Un autre exemple est la protéine Fis d'*E. coli*. Fis réprime l'initiation de la transcription en imposant un blocage, ou en ciblant un promoteur, empêchant l'ARN polymérase de se fixer. Fis peut également être un activateur de la transcription, en mettant des contacts physiques avec l'ARN polymérase. Un autre moyen est de modifier la courbure de l'ADN pour rapprocher spatialement un promoteur distant du gène à transcrire (Dillon and Dorman 2010)

En étudiant l'interaction protéine-ADN par l'expérience du Chip-Seq, nous voulions trouver des sites spécifiques où pouvaient s'attacher RecN.

Le Chip-Seq que j'ai réalisé avec le RecN-3XF (stabilisé) ne nous a pas permis de déterminer des régions promotrices particulières. Il nous a semblé, à l'inverse, y voir un défaut d'enrichissement dans les gènes activement transcrits tel que ceux de la réponse SOS. En effet, la transcription active de ces gènes peut rentrer en conflit avec le déplacement / positionnement d'autres protéines sur l'ADN. A titre d'exemple, il est connu que la réplication et la transcription de l'ADN qui se produisent simultanément chez les bactéries provoquent des conflits (Merrikh et al. 2012). Cela pourrait conforter le modèle où RecN une fois chargé sur l'ADN peut y glisser sans se fixer à une région spécifique.

4 Condensation du nucléoïde et cohésion des chromatides sœurs

RecN appartient à la famille des protéines de type SMC (Pellegrino et al. 2012) et est impliquée dans la réparation de l'ADN. Les SMC forment des complexes en interaction dynamique avec les chromosomes qui jouent des rôles essentiels pour contrôler la ségrégation chromosomique et l'intégrité génétique. La petite taille des bras de RecN pouvait faire penser que cette protéine ne fonctionnait pas comme les cohésines ou les condensines, mais des études biochimiques ont clairement démontré que RecN adopte une structure SMC (Pellegrino et al. 2012) et est capable de maintenir deux brins d'ADN proches (Keyamura and Hishida 2019). *In vivo*, les travaux de mon laboratoire d'accueil et d'autres groupes ont montré son rôle central dans la restructuration de l'ensemble du nucléoïde, en le condensant après induction de la réponse SOS (Vickridge et al. 2017; Klimova and Sandler 2020; Dunman et al. 2000). Le travail réalisé au cours de cette thèse confirme cette propriété et l'étend à la gestion des lésions à la BLM.

L'arrangement tridimensionnel des chromosomes est crucial pour la recherche d'homologie efficace par RecA, et par extension, pour aboutir à une RH effective (Ghodke et al. 2019; Uranga et al. 2017). Deux phénomènes distincts peuvent se produire pour expliquer la condensation du nucléoïde : soit une compaction globale de l'ADN favorisant la rencontre aléatoire d'homologues, soit un réalignement des régions homologues, sans exclure que les deux peuvent être concomitants. La dynamique du chromosome a été initialement étudiée par microscopie, dont la résolution est limitée. Afin d'avoir une vision sur l'ensemble du génome et pour déterminer le ou les rôle(s) de RecN pendant la réparation de la MMC et de la BLM, nous avons adapté à *E. coli* la technique du Hi-SC2 en présence de MMC ou de BLM.

4.1 L'action de RecN est dépendante du type de lésion

Nos résultats montrent que RecN contribue à maintenir les interactions entre chromatides sœurs sur l'ensemble du génome en présence de MMC, mais qu'il intervient peu ou pas pendant la période de récupération qui suit cette première phase, après élimination de la MMC. En revanche, en présence de BLM, RecN n'influence pas les interactions entre chromatides sœurs lors de la première phase, mais a un effet important pendant la période

de récupération. Étonnamment, cette différence n'est pas corrélée avec la compaction des nucléoïdes qui est entièrement sous le contrôle de RecN avec la MMC et la BLM.

Ces observations suggèrent que ces deux événements, la cohésion des chromatides sœurs et la compaction des nucléoïdes, pourraient ne pas refléter la même activité de RecN. De plus il est fort possible que RecA, par sa dynamique propre (Wiktor et al. 2021) soit suffisante pour initier une cohésion à courte distance sans RecN. Mais pour maintenir l'activité de RecA (recherche d'homologie efficace, stabiliser les D-loop), il faudrait le support de RecN. L'essentialité de RecN pour la survie à une cassure double brin récurrente provoquée par l-SCEI ((Vickridge et al. 2017) (données non publiées) ou trois cassures transitoires (Keyamura et al. 2013) suggère que ces différences ne s'expliquent pas par le nombre de lésions à gérer.

Nous proposons que les lésions induites par la MMC sont rapidement traitées par le NER. La littérature reprend régulièrement le modèle des adduits de MMC qui génèrent des CDB à l'arrière de la fourche de réplication. Pour tester ce modèle, nous avons réalisé un test en MMC, en présence et absence de réplication (par l'utilisation de la souche *dnac^{T5}*). Le résultat montre que le NER est essentiel pour induire RecN massivement, et vraisemblablement tous les gènes SOS, avec ou sans réplication. Comme RecN se lie préférentiellement à de l'ADNsb, il est envisageable de proposer qu'en MMC de nombreuses étapes du NER ne soient pas finalisées et génèrent de l'ADNsb (Weng et al, 2010), qui seront prises en charge par RecFOR pour engager la RH. Ceci devrait permettre un chargement massif de RecN sur plusieurs sites du chromosome. Une fois chargée, RecN empêche la ségrégation des chromatides sœurs et provoque la compaction du nucléoïde. Puis, dans la phase de récupération, la réparation progressive des régions simple brin favorise le déchargement de RecN et sa dégradation ultérieure.

En présence de BLM, l'activité de RecN n'est visible que tardivement, pendant la phase de récupération. Une explication possible de cette observation est que des substrats adéquats d'ADNsb ne sont pas immédiatement disponibles pour RecN. Les lésions de BLM produisent des CDB qui seront traitées par RecBCD et recouvertes par SSB et RecA. Puisque RecN n'est induit qu'à ce stade, nous supposons qu'il peut fonctionner seulement après la recherche initiale d'homologie et la formation de la boucle-D par RecA. A ce moment, son chargement

sur l'ADNsb pourrait stabiliser les boucles-D comme observé *in vitro* (Uranga et al. 2017). La réplication sur ces substrats chargés en RecN (à partir d'*oriC*, d'intermédiaires de réparation ou de la région terminale) pourrait expliquer l'augmentation importante du SCC que nous avons observée dans la phase de récupération.

4.2 Utilisation et limitation de la méthode Hi-SC2 pour étudier les interactions entre chromatides sœurs

La méthode de Hi-SC2 permet de mesurer les recombinaisons entre *loci* frères sur deux chromatides sœurs ou deux chromosomes homologues. Cette méthode nous est donc apparue comme adéquate pour mesurer l'activité cohésine de RecN. Les travaux antérieurs de mon groupe d'accueil avaient démontré que dans des conditions normales de croissance la fréquence de recombinaison entre chromosomes frères déjà ségrégués était très faible (Lesterlin et al. 2012). La compaction du nucléoïde observée lors d'un stress génotoxique change la donne et on pourrait envisager dès lors que les échanges entre chromatides sœurs ne sont pas les seuls à être détectés. Les observations différentes avec la BLM et la MMC suggèrent que les résultats Hi-SC2 ne sont peut-être pas directement interprétables comme de la cohésion des chromatides sœurs. Dans le futur, nous envisageons de compléter ces résultats avec des expériences de Sister-C (Oomen et al. 2020), une méthode dérivée du Hi-C, qui conserve l'information de l'appartenance à l'une ou l'autre des chromatides sœurs pour sonder l'organisation 3D des génomes en réparation.

Les expériences de Hi-SC2 présentent plusieurs limitations techniques. Pour diminuer leur variabilité nous avons utilisé une seule banque de transposition pour chaque mutant pour toutes les expériences. Cependant, il existe des limitations techniques possible venant du système Cre en présence de MMC. En effet la MMC peut produire des adduits entre deux brins d'ADN opposés. Nous ne savons pas comment ce type de lésions peut interférer avec le système de recombinaison Cre. Deux protéines Cre doivent pouvoir se positionner sur un site *loxP*, puis rentrer en contact avec d'autres Cre positionnées sur des sites identiques pour recombiner (Hamilton and Abremski 1984; Abremski and Hoess 1985; Van Duyne 2015). Or l'action des ILC pourrait rigidifier l'ADN ou les torsions produites pourraient modifier la dynamique de recombinaison ainsi que diminuer la reconnaissance des sites *loxP* par Cre.

Pour le Hi-SC2 nous avons choisi des conditions de culture en milieu riche afin d'être dans des conditions similaires à celles de l'expérience de TIS. Ce choix était nécessaire pour ne pas diminuer l'action de la BLM qui nécessite un milieu riche en Fe^{2+} ou Cu^{2+} pour être fonctionnelle (Tao Xu 2012; Abraham et al. 2003). L'inconvénient de ce choix expérimental, est que les chromosomes se répliquent de manière chevauchante et qu'il peut y avoir jusqu'à 16 origines pour 4 *termini* (Cooper and Helmstetter 1968; Skarstad and Katayama 2013). Nous ne savons pas comment cela impacte les processus de cohésion, compaction et réparation qui suivent l'arrivée des lésions.

En théorie le Hi-SC2 permet d'analyser les interactions au niveau de chaque locus ou une insertion s'est produite, environ 400 000 positions. En pratique les résultats à cette échelle sont difficilement interprétables, j'ai donc utilisé une moyenne glissante lissée sur 50 kb qui permet d'analyser l'allure globale du profil de recombinaison. Pour étudier les effets au niveau d'un gène, il pourrait être plus précis d'avoir une réplication lente et avec des souches synchronisées, une complexité de la banque de départ plus importante et une profondeur de séquençage plus grande.

4.3 Modèle sur le fonctionnement de RecN pour la cohésion des chromatides sœurs

RecN rapproche les chromatides sœurs. D'après les éléments rapportés on peut penser que le premier stade de la réorganisation du chromosome par RecN passe par la cohésion des chromatides sœurs, et qu'ensuite, les chromosomes vont être attrapés et se rapprocher pour finir par se condenser, pour induire une compaction globale du nucléoïde **Figure 44** et **Figure 45**.

MMC

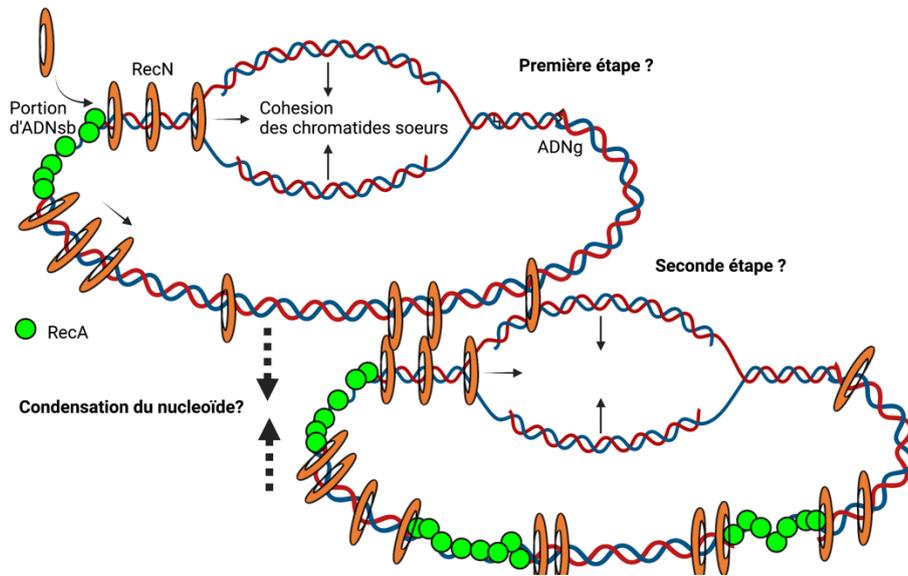


Figure 44 Étapes de cohésions / condensations à la suite de lésions en MMC

RecN (vert) se lie par l'intermédiaire de RecA à l'ADNsb créé par la voie NER. RecN se propage et/ou se polymérise à partir de son site de liaison. RecN rapproche les chromatides sœurs précédemment séparées. RecN pourrait favoriser dans un deuxième temps la compaction globale des nucléoïdes. Les flèches indiquent le sens de déplacement de RecN, l'impact sur les chromatides sœurs et potentiellement sur le mouvement des chromosomes.

BLM

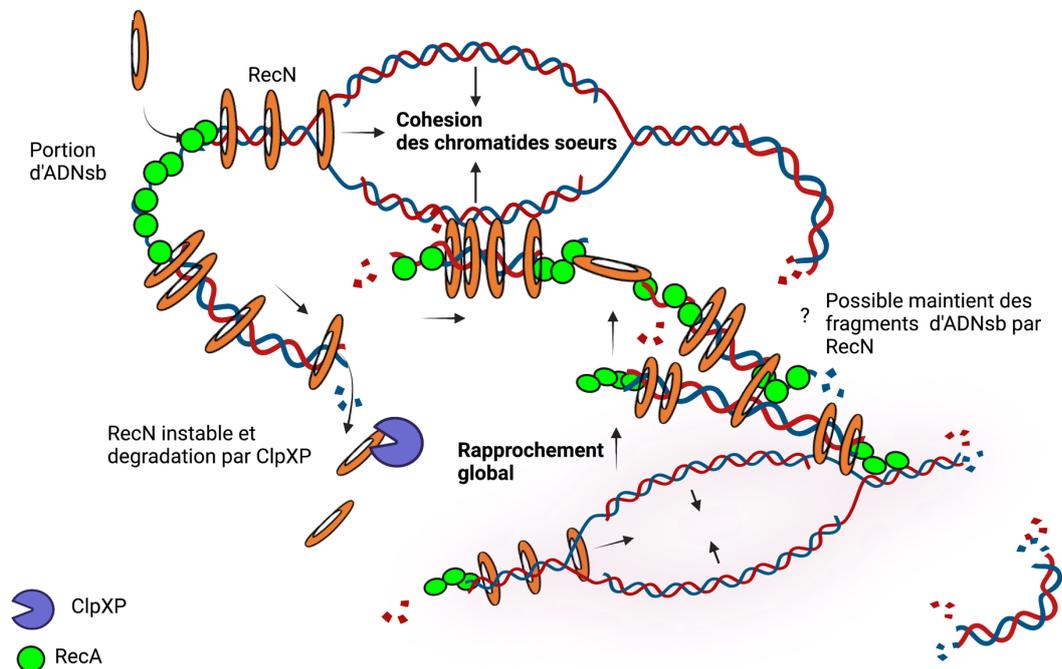


Figure 45 Étapes de cohésions / condensation à la suite de lésions en BLM

Le chromosome est fragmenté, la résection des portions d'ADN avec CDB est importante. Du fait des CDB, RecN ne peut rester sur l'ensemble du chromosome pour induire une cohésion rapide des chromatides sœurs. Il faut attendre la résection par RecBCD et le chargement de RecA. Plus tardivement, les différents fragments d'ADN se retrouvent rattachés à RecN et permettent une condensation tardive du nucléoïde.

RecN est nécessaire pour rapprocher des chromosomes déjà ségrégués mais nous ne savons pas si elle est suffisante.

L'équipe de Hongtao Yu a utilisé la microscopie à fluorescence pour visualiser comment la SMC de *Bacillus subtilis* (BsSMC) interagit avec de l'ADN. Ils rapportent que les BsSMC peuvent passer de phases statiques, à des phases de diffusion par glissement. A des concentrations plus élevées, les BsSMCs forment des clusters qui condensent l'ADN. Les BsSMC peuvent interagir de manière coopérative par le biais de leurs domaines de tête ATPase. En accord avec ces résultats, les mutants ATPase compactent l'ADN plus lentement que les BsSMC de type sauvage en présence d'ATP (Kim and Loparo 2016).

Les observations du groupe de S. Sandler suggèrent que cela pourrait être le cas puisque la surproduction de RecN en absence de lésions bloque le cycle cellulaire (Warr et al. 2019). Mes observations, à l'inverse, suggèrent que RecN a besoin d'un système de chargement sur l'ADN qui n'apparaît qu'après le traitement des lésions. Nous espérons que l'approche TIS nous donnerait des pistes pour identifier des partenaires directs de RecN. A l'exception du NER je n'ai pas pu en identifier pour le moment.

En utilisant des cellules non-replicative ou la division cellulaire est bloquée (*dnaC^{ts}* à température non permissive et traitement cephalexine), il serait possible de tester si la compaction des nucléoïdes après induction des lésions entraîne une augmentation des contacts entre *loci* frères grâce au Hi-SC2. On pourrait alors prouver que cohésion et compaction via RecN peuvent être découplés.

4.4 Élimination de RecN et reprise du cycle cellulaire normal

L'action de RecN est puissante. Elle est suffisamment « vigoureuse » pour déplacer et compacter l'ensemble du nucléoïde. Pour expliquer son action, on peut inférer, soit que RecN reste attachée à l'ADN tout ce temps, soit qu'elle se détache, et un flux continu de RecN arrive en permanence par des points d'entrées (CDB, ADNsb, RecA). Pour que le cycle cellulaire reprenne et les chromosomes ségrégent à nouveaux, il faut que les « menottes » libèrent leur emprise. Nous avons exploré ce terrain, avec une version stabilisée de RecN, RecN-3XFlag, et les mutants *ClpX/ClpXP* en espérant observer des phénotypes sur la reprise du cycle cellulaire. La viabilité de ces souches étant affectée, nos résultats ne sont pas concluants. Ce qui permet la dissociation de RecN peut être simplement une dynamique de dissociation liée à l'hydrolyse de l'ATP, ou à la simple baisse de l'induction de la réponse SOS suivie d'une dégradation totale de RecN. Il peut aussi s'agir d'un événement actif et contrôlé par d'autres partenaires ou protéases qui viendraient déloger RecN.

5 Ndd un antagoniste à l'action de RecN

Un phénomène intéressant, qui pourrait nous aider à comprendre le fonctionnement de RecN, a été découvert grâce à une étude menée en parallèle au laboratoire sur le bacteriophage T4. Le phage T4 produit la protéine Ndd. Des expériences anciennes montrent que l'expression de Ndd provoque la décompaction du nucléoïde et le repositionne au contact de la membrane cytoplasmique (Bouet, Krisch, and Louarn 1998). Nos expériences récentes montrent que l'expression de Ndd provoque un blocage des fourches de réplication en des *loci* particuliers, une induction très rapide du SOS et une production de RecN. De manière surprenante cette production de RecN ne permet pas la compaction du nucléoïde. Il est donc intéressant de se demander pourquoi Ndd arrive-t-elle à contrecarrer l'action de RecN bien que RecN soit induite. Cela est-il dû : au type de lésions produites, à une action bloquant son avancée ou à l'inhibition de ses partenaires ?

Sachant que Ndd peut s'accrocher à l'ADN, il est possible que Ndd puisse ancrer le chromosome à la membrane interne (directement ou indirectement), et créer des lésions à la fourche de réplication tout en bloquant l'avancée d'autres protéines tel que RecN **Figure 46**.

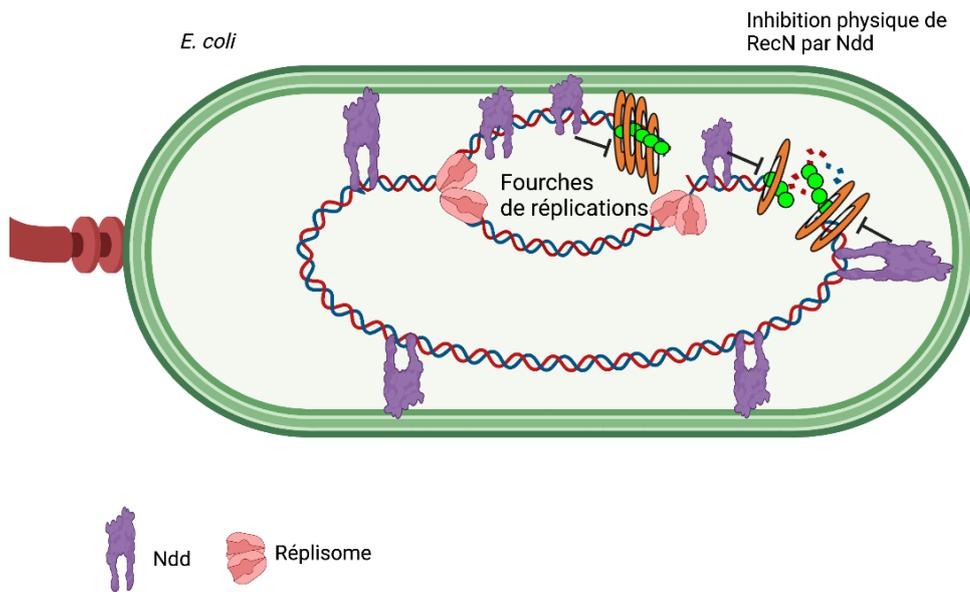


Figure 46 Modèle représentant un mode d'inhibition possible de RecN par Ndd

Ndd accrochée à la membrane interne d'*E. coli* et à l'ADN bloque le déplacement des protéines sur le chromosome, induisant des cassures doubles brins à la fourche de réplication et empêche la progression de RecN.

Si cette l'hypothèse est juste, il y aurait alors une accumulation de RecN à la fourche de réplication lésée, mais qui ne pourrait pas se mouvoir sur l'ADN. Pour savoir sur quelle portion d'ADN nouvellement répliqué RecN ou Ndd prend place en aval de la fourche de réplication, il est possible d'utiliser la technique l'iPond. L'iPond est une technique d'immunoprécipitation de la chromatine en ciblant de l'ADN ayant incorporé par réplication de l'EdU. L'ADN nouvellement répliqué est précipité *via* la biotine et les protéines qui lui sont associées sont analysées par immunoblot, Western Blot ou spectrométrie de masse (Dungrawala and Cortez 2015).

6 Remarques finales

Le fonctionnement de RecN est maintenant étudié depuis 10 ans dans l'équipe. En 2018, Elise Vickridge avait conclu sa thèse par « The complementary results obtained recently give rise to new questions and suggest a more complicated mechanism or maybe a dual function of RecN's action », voici les conclusions que j'apporte à cet édifice.

J'ai montré l'importance du pré-traitement des lésions pour stabiliser RecN et promouvoir la cohésion des chromatides sœurs (SCC) et par extension la RH ; ce résultat était particulièrement inattendu, bien qu'il soit bien apprécié que la RH et le NER travaillent en coordination (Li and Heyer 2008). L'importance du NER pour l'activité d'une protéine de RH n'avait pas encore été décrite chez *E. coli*. Récemment, une interconnexion similaire a été décrite chez la bactérie non répliquative *C. crescentus* entre NER et le TLS (Joseph et al. 2021). Ces connexions pourraient être plus fréquentes qu'on ne l'envisage.

Nos résultats du TIS et de test de viabilité en MMC suggèrent que RecN se charge fréquemment sur l'ADNsb généré par un traitement NER ou BER imparfait. La forte dépendance de RecN pour la réparation des CDB générées par des endonucléases montre qu'elle est également active sur les lésions traitées par RecBCD. En présence de MMC, les CDB semblent être rares. Le chargement de RecN sur de l'ADN traité à la BLM est moins évident car on observe ses conséquences tardivement sur les SCC. Peut-être qu'une accumulation de CDB ne permet pas un chargement suffisamment rapide de RecN, ou une perte d'une partie du chargement des RecN associés à l'ADN. Une future analyse épistatique à l'échelle du génome avec la technique du TIS sur des cassures de type I-SCEI pourrait aider à mieux comprendre les résultats obtenus en BLM.

En conclusion, mes travaux de thèses ont permis de mettre en évidence de nouveaux éléments dans la compréhension des systèmes permettant la réparation des CDB, ainsi que certains des rôles de RecN dans ce processus. RecN est positionné au carrefour de multiples voies de réparation, jouant un rôle dans l'activation de la RH et facilitant le fonctionnement de la voie du BER et tout en étant stimulée par le NER pour promouvoir le remodelage des chromatides sœurs et du nucléoïde. Son fonctionnement pourrait intervenir dans une voie encore non caractérisée avec RecO.

IX. Matériels et méthodes

1 Matériels et méthodes

1.1 Milieux de cultures

La majorité des expériences ont été réalisées en bouillon Luria (1 % de bacto-tryptone, 0,5 % d'extrait de levure, 1 % de NaCl, pH ajusté à 7,5 avec du NaOH) ou sur LB-agar (bouillon Luria + 1,5 % de bacto-agar).

Pour avoir des cellules en croissance lente, les cellules ont été cultivées dans le milieu minimal A (MMA) 1x (0,26 M KH_2PO_4 , 0,06 M K_2HPO_4 , 0,01M tri-sodium citrate, 2 mM MgSO_4 , 0,04 M $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$) complété par 0,2% d'acides casaminos et 0,2% de glucose. Le cas échéant des antibiotiques ont été utilisés pendant toutes les étapes de pré culture. La concentration de travail des antibiotiques est indiquée dans le **Tableau 5**.

1.2 Tableau des solutions

Tableau 5 Concentrations des solutions stocks

Produits	Concentrations stocks	Concentrations finales	Abbreviations
Kanamycine	50 mg/ml (dans H_2O)	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Kan
Chloramphenicol	30 mg/ml (dans Ethanol)	30 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Cam
2,6-Diaminopimelic acid	50 mM (dans H_2O)	0,6 mM	DAP
Ampicilline	50 mg/ml (50% H_2O /50% Ethanol)	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Amp
Tétracycline	5 mg/ml (50% H_2O /50%Ethanol)	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Tet
Rifampicine	50 mg/ml (dans Méthanol + NaOH)	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Rif
Spectinomycine	100 mg/ml (dans H_2O)	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Spec
L-arabinose	20% mg/ml (dans H_2O)	0.1%	L-ara
Isopropyl b-D-thiogalactoside	1 M (dans H_2O)	0.1 mM	IPTG
5-Bromo-4-chloro-3- indolyl-β-D- galactopyranoside	5 mg/ml	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	X-Gal

1.3 Souches

Les souches utilisées durant ma thèse sont listées dans le **Tableau 6**. Toutes les souches sont isogéniques d'*E. coli* MG1655. Les constructions de souches ont été réalisées soit par transduction P1, soit par recombinaison homologue *via* le système « lambda red » en utilisant DY330. Les clonages et électro-transformations : Champ électrique : 2500 V/cm; résistance 200 Ω ; capacitance 25 μ F et sélectionné pour leur résistance à l'antibiotique.

1.4 Préparation d'un lysat liquide de phage P1 :

Les lysats ont servi de vecteur pour le transfert d'une mutation sélectionnable, de la souche lysée vers une souche receveuse.

Pour réaliser un lysat, 200 μ l de culture de nuit d'*E. coli* donneur ont été prélevés. Un lysat P1 "neutre" pré-existant est nécessaire. Il est dit neutre car il a été réalisé sur une souche MG1655 sans résistance à des antibiotiques. Pour le témoin négatif, aucun lysat n'a été rajouté. Contrairement aux autres cultures, 10 μ l et 20 μ l de lysat neutre titré de 10^9 à 10^{10} pfu/ml P1 $_{vir}$ stock a été ajouté. Le mélange a été laissé à 37°C sans agitation pendant 5 min. Les 200 μ l de culture ont été ensuite ajoutés à 5ml de LB supplémenté avec 5mM de CaCl₂. Au bout de 4-5h, la culture doit devenir claire à l'impide dû à la lyse. 1,5 ml de ce lysat a été prélevé et 50 μ l de chloroforme y ont été ajoutés pour éliminer les bactéries restantes. Après agitation et incubation durant 15 min avec le chloroforme, le lysat a été centrifugé à 6 000 x *g* durant 5 min. La fraction aqueuse a été transférée pour être conservé à 4°C.

1.5 Transduction à partir d'un lysat liquide de phage P1 vir

La transduction à partir d'un lysat de bactériophage P1 est une procédure génétique utile pour déplacer des mutations sélectionnables d'intérêt d'une souche d'*E. coli* à une autre. Le lysat est utilisé pour infecter un second hôte (receveur) lors de la phase de transduction. Il est important d'utiliser un phage P1 $_{vir}$ car la mutation *vir* empêche le phage d'entrée en phase lysogénique parmi les transductants. Le fragment d'ADN du receveur vers le donneur, va être intégré par recombinaison homologue. Pour réaliser la transduction, la culture de nuit a été diluée au 1/100 en LB supplémenté de CaCl₂ à 5 mM. Les cultures bactériennes ont ensuite

été cultivées à 37°C (ou 30°C dans le cas de souches thermosensibles) jusqu'à DO_{600nm} : 0.6 . 1ml de culture est prélevé par tube, auxquels sont ajoutés 10 à 30µl de phages. L'incubation a été réalisée durant 20 min sans agitation à 37°C. Les cellules ont été ensuite centrifugées à 6 000 x *g* 5 mn puis reprises dans 1ml de LB NaCl à 7.5 mM et finalement incubées 2h à 37°C sous agitation. L'ensemble a été ensuite étalé sur LBA supplémenté en NaCl à 7.5 mM avec l'antibiotique de sélection adéquat.

1.6 Construction de RecN-3XF

Le peptide 3X FLAG est un peptide synthétique de 24 acides aminés. Sa séquence est composée de 3 répétitions du peptide de huit acides aminés : Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys. Le peptide 3X-FLAG a été inséré par recombinaison homologue en C-terminal de RecN. Une séquence de liaison « linker » de 11 Alanines, permet de dissocier le peptide 3X-FLAG du cœur de la protéine. Le vecteur matrice de la PCR pour insérer le 3X-FLAG est p3xFLAG-CMV.

1.7 Test de viabilité

Les pré-cultures ont été diluées au 1/200 dans du LB puis incubées à 30°C et 150 rpm sans antibiotique jusqu'à DO_{600nm} : 0,15-0,20. 200µl de cultures de chaque souche ont été diluées en série dans une plaque 96 puits jusqu'à 10^{-7} . Neuf µl ont été déposés sur LBA et incubés durant la nuit à 37°C. Cette dilution est le contrôle de la quantité de bactéries dans chaque culture. Puis, la MMC 5 µg/ml ou BLM 1 µg/ml ont été alors ajoutées aux cultures pour une durée variable. Pour chaque échantillon traité, il a été refait une dilution et un dépôt sur LBA toutes les 20 min. Le lendemain, les CFU en gouttes ont été comptées.

1.8 Western-Blot

Le Western-Blot (WB) est une technique permettant de déterminer la présence de protéines d'intérêt et d'estimer leur taille. **Extraction des protéines** : Les extractions protéiques ont été réalisées sur des cultures d'*E. coli* dans différentes conditions expérimentales. Ici, 1 ml d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm}=0,3$) a été prélevé pour être centrifugé 3 min à 6 000 x *g*. Le culot obtenu a été remis

en suspension dans 100µl d'un tampon de lyse préservant les protéines (Trizma 20 mM pH8, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, pour 50 ml a été ajoutée une tablette de « Complete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail ROCHE » MERCK), et 1µl de « Ready-Lyse™ Lysozyme » solution (MERCK). Les cellules ont ensuite été lysées et l'ADN fragmenté par sonication au Bioruptor Pro Diagenode durant 15 cycles (30 sec ON et 30 sec OFF, à 4°C, intensité maximale). Le lysat obtenu a été ensuite centrifugé 15 min à 15 000 x g à 4°C pour éliminer les débris membranaires. 100µl de surnageant ont été récupérés et mélangés dans 100µl de tampon Laemmli 2X, puis incubés 10 min à 95°C. **Électrophorèse** : 10µl d'échantillons ont été déposés par puits, dans un gel de polyacrylamide dénaturant avec gradient 4-15%, ou 7,5%, « Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast Gels » (BIO-RAD). La migration s'effectue en tampon TGS [Tris-HCl 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1 ajusté pH8] à 150V pendant 1h à 2h selon les besoins. **Transfert des protéines sur la membrane** : Le transfert a été réalisé par : « transfert semi sec » sur membrane Polyvynil Difluoride (Trans-Blot Turbo Mini 0.2 µm PVDF Transfer Packs #1704156) avec le Trans-Blot® Turbo™ protocole 1.5 mm GEL 10 min. **Hybridation des anticorps** : la membrane a été saturée dans un tampon TBS-Tween-20 à 0,1% (TBST), avec du lait écrémé à 10%, pendant une heure sous agitation (150 rpm). Puis elle a été placée dans un tube falcon 50ml, la face avec les protéines tournée vers l'intérieur. 5ml de TBST au lait 10% écrémé et l'anticorps primaire dilué au 1/1 000^e ont été ajoutés. L'incubation s'est poursuivie une nuit à 4°C sur un système de roulement continu. La membrane a été rincée 3 fois 10 min à température ambiante avec du TBST sous agitation 150rpm. Puis elle a été mise en contact avec l'anticorps secondaire à une concentration de 1/5 000^{ème} de la même façon que l'anticorps primaire, co-incubé avec l'anticorps anti-ARN-polBeta (ARNpolB) couplé à l'enzyme HRP (« Direct-Blot HRP anti-*E. coli* RNA Polymerase beta » de OZYME) qui lui a été dilué au 1/20 000^{ème} à température ambiante durant 1h. Une dernière série de 3 lavages identiques au précédent a été effectuée. **Révélation quantification** : Pour pouvoir quantifier la protéine RecN en minimisant les biais techniques, tels que les concentrations inégales de l'échantillon de protéines, le chargement inconsistant d'un puit à l'autre, ou les variations du transfert, les mesures ont été normalisées avec un contrôle interne à partir d'un anticorps dirigé contre l'ARNpolB. La concentration de l'ARNpolB n'est pas affectée par les conditions expérimentales. Elle est détectée dans la même gamme linéaire que RecN et n'interfère pas avec sa détection. **La révélation** a été faite en chimiluminescence ECL (SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate de

ThermoSCCentific) avec le système d'imagerie : FUSION FX (en « High Sensitivity », ouverture 1.24). Le mode d'exposition en série « incrémentale » a été sélectionné, en veillant à ce que les acquisitions n'atteignent jamais la saturation maximale de la dynamique. **La quantification des signaux** a été effectuée avec le logiciel « Bio-1D software ». La détection du marquage a été réalisée avec le mode « rolling ball », vérifié individuellement, puis ajusté manuellement. Nos calibrations ont montré que l'option « valeur de l'intensité maximale », plutôt que « l'aire de la bande », donnait la meilleure linéarité de la réponse du marquage. Les résultats sont exprimés sous la forme du ratio Quantité de RecN / Quantité d'ARN polymérase Beta.

1.9 Test de dégradation de RecN

Le protocole de référence pour ce travail est (Sun et al. 2013). Des expérimentations *in vitro* ont été réalisées à partir de protéines purifiées de RecN, UvrA, UvrB, UvrC par nos collaborateurs ou du RecA commercial (NEB ref : M0249S). L'extrait brut d'*E. coli* a été préparé dans notre laboratoire à partir du protocole (Sun et al. 2013). Les quantités de protéines utilisées sont de 45 pico Molaire par réaction pour chaque protéine, dans un volume final de 120µl. L'ADN utilisé "M13mp18 SSDNA circulaire NEB" à 0,25 µg/µL ou « M13mp18 RF I DNA dsDNA circulaire NEB » à 0,1 µg/µL ou de l'ADNg extrait. Les buffers de réactions **Tableau 6 Buffer de test de dégradation** . Les mélanges ont été effectués à 4°C puis la réaction incubée dans un bain mari à 30°C. Les prélèvements ont été réalisés toutes les 10 min. Les westerns blots et les quantifications ont été réalisés comme décrit précédemment partie Western Blot du Matériel et méthode.

Tableau 6 Buffer de test de dégradation de RecN

Buffer d'énergie		
Produit	Concentration finale d'utilisation	Référence
HEPES : pH8	700 nM	H6147 Sigma-Aldrich
ATP pH 7.5	52 nM	A8937 Sigma-Aldrich
Spermidine	14 mM	85558 Sigma-Aldrich
Buffer de dilution		
Aspartate-MG	10 mM	49605 Sigma-Aldrich
K-glutamate	50 mM	G1149 Sigma-Aldrich
DTT	3 mM	20290 Sigma-Aldrich

1.10 Test d'expression de la réponse SOS

Une culture de nuit de souches contenant le plasmide pRecN_GFP, a été dilué au 1/200 en LB puis mis en culture jusqu'à $DO_{600nm} : 0.1$ à $37^{\circ}C$ et $250\mu l$ ont été déposé par puits, dans une plaques 96 puits (BD Falcon 96 Flat Black) avec une cassette d'humidité large, sans couvercle. A $DO_{600nm} : 0.2$, la BLM ou la MMC a été rajouté aux concentrations respectives de $5\mu g/ml$ ou $1\mu g/ml$. L'acquisition des données a été réalisée au TECAN-SPARK, à $37^{\circ}C$, sous agitation « double orbital » $72rpm$ amplitude $4mm$.

1.11 Chip-Seq

Le chipSeq a été réalisé en suivant le protocole de El Sayyed (El Sayyed et al. 2016). Le contexte de l'expérience est le suivant : le cycle de réplication du chromosome des MG1655 a été synchronisé en utilisant l'allèle DnaC^{TS} incapable d'initier la réplication à partir de 39°C. Les cellules ont été cultivées sur la nuit, puis diluées au 200^{ème} dans 100ml en milieu MMA supplémenté avec du glycérol 0,2% et casamino 0,2%. Les cellules ont été synchronisées à DO_{600nm} :0.2, à 39°C durant 90 min. Puis l'initiation a été permise en ajoutant 1/3 de MMA à 4°C, puis en les incubant directement à 30°C durant 10 min. Au bout de 10 min, les cultures ont été remises à 39°C pour bloquer une seconde initiation de réplication et la MMC 10 µg/ml a été ajoutée. Les cultures ont été fixées avec du paraformaldehyde (concentration final 1%), aux temps 13, 23 et 33 min. Puis de la glycine 5mM a été ajoutée. Ensuite, les cellules ont été lysées dans un tampon de lyse, (Trizma 20 mM pH8, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, pour 50ml a été ajouté une tablette de « Complete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail ROCHE » MERCK). La fragmentation par ultrason des échantillons d'ADN a été réalisée au Bioruptor Pro (Diagenode®) soit 15 cycles alternant 30 sec ON/ 30 sec OFF, à la puissance maximale. L'immuno-précipitation, les anticorps commerciaux utilisés « ANTI-FLAG® M1 « Agarose Affinity Gel », ont été utilisés en suivant le protocole indiqué par le fabricant. Le séquençage a été réalisé sur un NextSeq 500 (Illumina) en « *Single-end sequencing* » de 50 bp, avec un total de 300-400 M de lectures par cellule de flux.

1.12 Tn-Seq

Nous avons utilisé un transposon Mariner pour réaliser l'expérience de Tn-Seq (van Opijnen, Bodi, and Camilli 2009) tel que décrit dans le protocole de (Yamaichi and Dorr 2017). La première étape consiste à construire la librairie de transposition, c'est-à-dire la population de bactéries qui intégrera un transposon aléatoirement au niveau d'un di-nucléotide 5'-TA-3'. La deuxième étape consiste à soumettre cette librairie à une pression de sélection (MMC ou BLM) et de récupérer les survivants après une phase d'amplification. La troisième étape consiste donc à collecter l'ADN des bactéries ayant survécu et s'étant développées. *In fine*, un séquençage haut débit est réalisé pour connaître et quantifier les points d'insertion des transposons.

Construction de la librairie de Transposition : la souche donneuse, *E. coli* SM10 MFD_{pir}, porte le transposon sur le plasmide conjugatif pSC189. Nous avons cultivé les souches donneuses et receveuses en LB à 30°C à 150rpm supplémentées avec les antibiotiques adéquats, en présence de 0,6mM de DAP (26-diaminopimelic acide) pour la souche donneuse et sans DAP pour la culture de la souche receveuse. Tous les produits ont été utilisés aux concentrations usuelles. Pour avoir plus de 1 million insertions indépendantes, 3 réactions de conjugaisons ont été réalisées. Pour ce faire, un lavage en LB + DAP a été réalisé sur 3 culots de 500µl par souche. Une fois re-suspendu dans le même volume de LB + DAP ; 500µl de la souche donneuse et 500µl de la souche receveuse ont été mélangés. Les mélanges ont été centrifugés à 6 000 x *g* durant 5 min. Le surnageant a été éliminé et les culots ont été re-suspendus dans 20µl de LB. Les culots ont été déposés sur un papier filtre MF-Millipore de porosité 0,45 µm, préalablement déposés sur LBA supplémenté en DAP. La réaction de conjugaison a eu lieu durant 1h30 à 37°C. Après conjugaison, le papier filtre a été rincé dans 12ml de LB. 100µl ont été utilisés pour calculer la CFU. 250µl ont été étalés sur chacune des 5 boîtes de Pétri de 19 cm de diamètre de LBA + Kan. Les boîtes ont été incubées 20h à 30°C. Nos calibrations ont montré que ce protocole permet d'obtenir 150K à 200K colonies par 200µl final, soit environ 3 200 000 conjuguants, par goutte de conjugaison. Le jour suivant, toutes les colonies des 5 boîtes ont été récupérées en les raclant avec un râteau et en les mélangeant dans 30ml de LB. Les cellules ont été vortexées puis centrifugées 5 min à 6 000 x *g*. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont été re-suspendues dans 30ml de LB. La DO a été ajustée à DO_{600nm} : 0,03 dans 45ml de LB à 30°C et 150rpm jusqu'à DO_{600nm} : 0,15. L'agent génotoxique a été ajouté durant 20 min. Pour la condition contrôle, aucun agent toxique n'a été rajouté. La totalité de la culture a été lavée 3 fois, par centrifugation 3 min à 6 000 x *g* puis re-suspendu dans 45ml de LB. Une fois les lavages terminés, les cellules ont été étalées sur 5 boîtes de Pétri carrées de 19cm de côté. On cible à récupérer 500k et 1 000k de colonies. La concentration en cellule déposée est dépendante du taux de survie du mutant, ces caractéristiques ont été évaluées préalablement. Les boîtes ont été ensuite mises en culture à 30°C durant 20h. Le lendemain, les cellules ont été raclées dans du PBS, puis culotées, et congelées avant d'extraire l'ADN génomique. Chaque culot doit contenir 5. 10⁸ pour réaliser 5 extractions d'ADNg en une cession dans un tube de 5ml.

Construction de la librairie de séquençage : l'ADNg de 5×10^9 bactéries a été extrait avec le kit Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Purification Kit, puis élué dans 80 μ l d'Elution Buffer (sans EDTA). La quantité d'ADN récolté doit être entre 250 ng à 500 ng/ μ l par échantillon. L'ADN est ensuite fragmenté par sonication en suivant le protocole du sonicateur diagenode : Tube de sonication 1,5ml. Volume par tube 250 μ l. Concentration d'ADN : 100 ng/ μ l. Quantité d'ADN total 25 μ g / tube. Les tubes sont placés dans la glace 5 min avant sonication. La sonication se fait à 4°C. Pour avoir des fragments entre 500 et 800 pb, 20 cycles 30 sec on / 30 sec off, de puissance « Low » sont réalisés. La fragmentation a été vérifiée sur gel 1%. L'ADN a été traité avec « NEB Quick Blunting Kit » selon les recommandations du fournisseur dans le même tube de fragmentation puis, placer dans un bloc à 27°C. Chaque échantillon a été purifié dans 3 colonnes Mini Elute PCR purification Quiagen et élué dans 35 μ l H₂O, pour une concentration approximative de 120 μ g/ μ l. Une queue poly A a été réalisée à partir de 35 μ l d'ADN de l'étape précédente. 5 μ l du buffer 10x de la Taq DNA polymerase (NEB), avec 10 μ l 10mM dATP et 3 μ l Taq DNA polymerase. L'ensemble est incubé à 72°C 45 min puis purifié sur deux colonnes de purification comme précédemment. Après avoir vérifié 4 μ l par électrophorèse sur gel 2% et mesuré la concentration en ADN au nanodrop. On récupère approximativement de 70 μ g/ μ l. La ligation des adaptateurs a été réalisée dans un unique tube. La préparation des adaptateurs a été réalisée avec 2.4 μ l 100 μ M "chain terminator" 5'-TACCACGACCA-NH₂-3' ; 2.4 μ l 100 μ M "index fork adapter" (5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTCGTGGTAT-3'), puis 0.2 μ l MgCl₂ 2mM avec 13 μ l H₂O. Le mélange a été chauffé à 95°C dans un bloc de métal et laissé refroidit jusqu'à température ambiante. Une fois le mélange prêt, la ligation suivante permettant de fusionner aux fragments d'ADN avec la queue « poly A » a été réalisée. 1.2 μ g d'AND purifié de l'étape précédente. 0.8 μ l du mix d'adaptateur. 1.5 μ l 10x T4 DNA ligase buffer, complété à 14 μ l H₂O, avec 1 μ l T4 DNA ligase, puis incubé à 16°C sur la nuit. Après incubation sur la nuit, il a été ajouté 8 μ l H₂O, 1 μ l 10x T4 DNA ligase buffer et 1 μ l de T4 DNA ligase durant 2h à 16°C afin de s'assurer que la réaction soit totale. Note : la quick DNA ligase fonctionne également avec le protocole du fournisseur. L'ADN est purifié sur colonne avec 60 μ l d'eau préchauffé à 40°C. A partir de cette étape il est recommandé de prendre des « DNA low binding tubes ». La concentration récupérée était autour de 20 à 30 ng/ μ l dans 60 μ l. Amplification de l'ADN génomique contenant un transposon par PCR. La PCR suivante a été réalisée : 500ng d'AND ligué de l'étape précédente. 50 μ l 5x Phusion high fidelity PCR buffer 1.25 μ l 100 μ M

Himar3out primer (5'-CGCCTTCTTGACGAGTTC-3'); 1.25µL 100µM Index R primer; 6.25µL 10mM dNTPs mix; qsp 250µL H₂O; 1.25µL Phusion DNA polymerase. Puis ont été aliquoté cinq tubes PCR tubes de 50µL. Le protocole de PCR a été réalisé avec le programme suivant. Dénaturation primaire : 1 = 98°C 1 min. Dénaturation : 2 = 98°C, 10 sec. Hybridation : 3 = 53°C, 30 sec. Synthèse : 4 = 72°C, 30 sec. Amplification : 5 = répéter étape 2, 29 fois. 6 = 72°C for 10 min. A la fin des cycles, deux tubes PCR ont été associés (100µl) pour les purifier sur colonne dans 50µl d'eau. Association des bar-codes illumina et des séquences de variabilités **Tableau 7**. La réaction de PCR suivante a été réalisée : 500ng d'ADN du produit de PCR purifié précédent. 50µL 5x Phusion high fidelity PCR buffer ; 1.25µL 100µM P5 spacer primers (d'un mélange des 6 équimolaire) ; 1.25µL 100µM P7 barcode primer ; 6.25µL 10mM dNTPs mix ; qsp avec H₂O jusqu'à 250µL. Puis il a été ajouté 1.25µL Phusion DNA polymérase en 5 tubes PCR de 50µl. Programme PCR : 1 = 98°C 1 min ; 2 = 98°C 10 sec ; 3 = 55°C 30 sec ; 4 = 72°C 30 sec ; 5 = goto n°2, 17 fois ; 6 = 72°C 10 min. 2 tubes PCR / colonnes, ont été purifiés sur colonne, et élués dans H₂O. La sélection de taille a été réalisée à partir du protocole SpriSelect. La cible désirée est entre 280 - 540 bp tel que décrit dans le protocole "double size sélection ». Le volume finale de l'éluion est de 17µl. Une partie est vérifiée avec 2µl d'ADN purifié sur un gel de 2% d'agarose en 0.5x TAE buffer. Les concentrations peuvent varier de concentration sont autour de 15 ng/µl après avoir mesurée au QuBit dsDNA HS.

Tableau 7 Des amorces du du TnSeq

Nom	Séquences (surlignées les régions complémentaires)
chain terminator	5'- TACCACGACCA _{NH2} -3'
'index fork adapter'	5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC TGGTCGTGGTA T-3'
Himar3out primer	5'-CGCCTTCTTGACGAGTTC-3'
Index R primer	5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTG-3'

Nom	Séquence : (les régions variables sont soulignées. Elles servent à générer de la diversité, pour permettre à illumina de se calibrer correctement).
Tn-Seq_P5spacer_1	5'AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGACTTATCAGCCAACCTGT-3'
Tn-Seq_P5spacer_2	5'AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT <u>G</u> ACTTATCAGCCAACCTGT-3'
Tn-Seq_P5spacer_3	5'AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT <u>A</u> TGACTTATCAGCCAACCTGT-3'
Tn-Seq_P5spacer_4	5'AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT <u>I</u> GTCGACTTATCAGCCAACCTGT-3'
Tn-Seq_P5spacer_5	5'AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT <u>C</u> GACGACTTATCAGCCAACCTGT-3'
Tn-Seq_P5spacer_6	5'AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT <u>G</u> CAGCGACGACTTATCAGCCAACCTGT-3'

Nom	Séquence P7 : il est possible d'utiliser les primers de kit pour séquençage. Ce sont les mêmes.
AD006	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>ATTGGCGT</u> GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-3'
AD012	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>TACAAGGT</u> GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-3'
AD005	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>CACTGT</u> GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-3'
AD015	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>TGACAT</u> GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-3'
AD002	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>ACATCGGT</u> GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-3'
AD016	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>GGACGGT</u> GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-3'

Procédure d'Analyse du Tn-Seq : Pour valider la reproductibilité du Tn-Seq, des triplicat biologique ont été effectué. Le logiciel utilisé est « Tn-Seq explorer » V1.5b avec les paramètres : --very-sensitive-local. Toutes les séquences localisées sur le génome sont comptées et conservée jusqu'à 5 000 insertions maximum, au-delà nous considérons que c'est une amplification non spécifique par PCR et ces valeurs sont éliminée. Référence du génome *E. coli* U00096.genes. Toutes les insertions ont été normalisées par le nombre de TA avec Tn explorer 1.5b. Les insertions du transposon, localisé dans le gène à -5% et la fin du gène -20% ont été éliminées afin de s'assurer que, quand il y a l'insertion du transposon, la fonction du gène est éliminée. Les paramètres utilisés pour scanner le génome : longueur de la fenêtre

1000 bp par étape 5 bases. Ont été normalisé les valeurs du nombre d'insertion de chaque gène, par le nombre total d'insertion conservé dans la condition. Tous les gènes avec 0 à 2 insertions dans la condition de référence WT_NT sont considérés comme gènes essentiels ou non informatifs. Ceci a été déterminé empiriquement à partir de nos données, sur le nombre d'insertions que l'on pouvait trouver dans certains gènes essentiels tel que le ribosome et l'ARN polymérase. Puis les rapports ont été fait entre différentes conditions.

1.13 Hi-SC2: Création de la banque de transposition.

Système Cre et construction de la librairie. Les sites *loxP* ont été introduits par conjugaison puis transposition. La conjugaison a été réalisée entre *E. coli* β -2163 (souche donneuse) et *E. coli* MG1655 (souches isogéniques réceptrices) ces dernières possèdent le système de recombinaison Cre, introduit préalablement sur le génome par recombinaison grâce au système « *lambda-red* », au site *lacZ*. Le plasmide suicide servant de vecteur de conjugaison, et à la transposition servant des sites *loxP* est dérivée du plasmide pSWT23 (Demarre et al. 2005) (van Opijnen, Bodi, and Camilli 2009). Il porte la transposase du transposon magellan5 Mariner et un marqueur de résistance à la kanamycine flanqué des répétitions inversées du transposon (Himar) dans lequel a été inséré un site de restriction Mmel pour faciliter l'analyse de la position d'insertion par séquençage à haut débit (van Opijnen et al., 2009). Ils sont intégrés sous forme d'une cassette de deux sites *loxP*, orientés dans le même sens, et séparés par 21 bp afin de s'assurer que l'excision ai uniquement lieu après répllication et non à partir de la même molécule. Le gène *cre* a été placé sous le contrôle du promoteur (P_{BAD}). Afin de s'assurer qu'il n'y a pas de recombinaison spontanée dû à la fuite d'expression du promoteur le promoteur du gène *lacZ* a été inséré avec une orientation inversée ($invP_{lac}$) à la fin de *cre* pour pouvoir le réprimer. L'activation de $invP_{lac}$ inhibe la fuite de transcription de P_{BAD} en absence d'arabinose. L'IPTG a été ajouté aux différentes étapes de la culture et préculture, afin de s'assurer qu'il n'y ait pas de recombinaison non désirée avant l'induction à l'arabinose. Le protocole de référence pour ce travail est (Espinosa, Paly, and Barre 2020). **Préparation de la banque de transposition.** La banque de transposition a été réalisé comme pour le Tn-Seq sur la base du protocole (Yamaichi and Dorr 2017). A partir de cultures de nuit, en LB à 30°C à 120 rpm supplémentées avec les antibiotiques adéquats, en présence de DAP (concentration

de 0,6mM) pour la souche donneuse β -2163 (déficiente pour la synthèse de cette acide aminé composant la paroi bactérienne) et de la souche réceptrice possédant Cre, en présence d'IPTG à 0,1mM (afin d'éviter toutes fuite d'expression de la recombinase). Tous les produits sont utilisés aux concentrations usuelles se référer au **Tableau 5 Concentrations des solutions stocks**. Cinq réactions de conjugaisons indépendantes ont été réalisées. Pour ce faire, un lavage en LB + IPTG + DAP a été réalisé sur 3 culots de 500 μ l de culture de nuit pour chaque souche. Une fois re-suspendu dans le même volume, 500 μ l de donneur et 500 μ l de receveur ont été mélangés, puis centrifugés à 6 000 x *g* durant 3 min pour les concentrer dans 20 μ l et la totalité a été déposée sur un papier filtre MF-Millipore de porosité 0,45 μ m, préalablement déposée sur LBA supplémenté en DAP + IPTG. Sur chaque papier filtre ont été déposées 5 gouttes de réaction de conjugaison. La réaction de conjugaison a eu lieu durant 2h à 37°C. Après conjugaison, les papiers filtres ont été rincés dans 1ml de LB + IPTG : pour un papier filtre, ont été 6ml de LB+IPTG. 6 μ l ont été mis de côté pour calculer la CFU. 1,5ml a été ensuite étalé sur quatre boîtes de 19cm de coté de LBA + Kan + IPTG, (pour la sélection des conjuguant en s'assurant d'avoir des colonies isolées). Les boîtes ont été incubées 16H à 30°C. Le jour suivant, toutes les colonies des quatre boîtes ont été récupérées en les raclant avec un râteau dans 30ml de LB + IPTG. Les cellules ont été vortexées afin de les dissocier complètement puis ont été centrifugées 10 min à 6 000 x *g*. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont été re-suspendues dans 10ml de LB + IPTG. Aux aliquots de 1ml a été ajoutés 1ml de Glycérol 50%. Les bactéries ont été congelées dans de l'azote liquide et conservées à -80°C. **Hi-SC2 test** : les aliquots de la librairie de transposition ont été mis sur glace pour les décongeler. Les cellules ont été cultivées jusqu'en phase exponentiel de croissance (OD_{600} : 0.2) à partir de 10^8 cellules diluées dans 100ml de LB avec IPTG (OD_{600} initiale de : 0.05). Puis 1ml de culture (4.10^8 cellules) a été centrifugé et transféré dans 40ml d'un nouveau milieu de culture sans IPTG à 30°C à 180 rpm. Après 90 minutes à OD_{600} : 0.1, l'agent génotoxique a été ajouté durant 20 min pour les conditions en présence de stress. A la fin des 20 minutes, trois lavages en LB à température ambiantes ont été effectués par successions de centrifugation à 6 000 x *g* durant 3 min. Puis l'arabinose 0,1% a été ajouté durant 60 minutes. 10ml ont été culoté, pour ensuite être congelé sans le surnageant dans de l'azote liquide et conservé à -20°C, avant l'extraction de l'ADNg. **Construction de la librairie du Tn-Seq pour séquençage illumina**. L'ADNg de 10^9 bactéries (DO_{600nm} : 2) a été extrait avec Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Purification Kit. 5 μ g d'ADN a été digéré avec l'enzyme de restriction MmeI (NEB) durant 4h à 37°C. L'ADN

digéré a été purifié sur colonnes avec le kit QIAGEN MinElute Purification Kit. Les fragments de digestions compris entre 800 et 2 000pb contenant le transposon avec les sites de recombinaison *loxP*, ont été purifiés au PippinPrep (SAGE science). 400ng d'ADN purifié ont été ligués aux adaptateurs avec la T4 DNA ligase (NEB) sur la nuit à 16°C. L'ADN ligué, a ensuite été purifié à l'aide de colonnes MiniElute (QIAGEN). Pour chaque librairie, 3 réactions de PCR ont été réalisées en utilisant la polymérase Phusion (ThermoFisher Scientific), environ 100ng d'ADN ont servi de matrice. Pour chaque échantillon, une paire de primers Illumina (tableau S4, P5 et P7) leur a été attribuée. Les réactions PCR ont été réalisées en utilisant les paramètres suivants : 98°C - 30s ; 24 cycles à 98°C- 30s ; 68°C – 30s, 72°C – 30s ; et à la dernière étape : 72°C durant 5 minutes. Les produits PCR ont été purifiés à l'aide d'une colonne MiniElute (QIAGEN). Selon les besoins diluer dans 100µl afin de réaliser la purification pour enlever la matrice d'ADN ainsi que les oligos à l'aide de billes magnétiques AMPure XP (LIFE SCIENCE). Le séquençage a été réalisé sur un NextSeq 500 (Illumina) en « *Paired-end sequencing* » de 2 x 75bp, avec un total de 300-400M de lectures par cellule de flux. L'objectif a été d'obtenir 20M de séquences pour chaque échantillon. **Analyse des données de séquençages.** Comme pour tous les séquençages Illumina en paires, deux fichiers de séquence en format « .fastq » ont été fournis. Le fichier étiqueté "R1" correspond à la position du reporter tandis que l'autre fichier avec "R2" contient le statut du reporter. Comme les deux fichiers sont couplés, ils doivent être traités ensemble. Ici les fichiers de résultats sont indiqués comme `samplename_R1.fastq` et `samplename_R2.fastq`. Dans notre cas, les séquences P5 et P7 ont été éliminées par la plateforme de séquençage. Premièrement, les codes-barres et les séquences adaptatrices ont été retirés des séquences à l'aide de Cutadapt. Chaque adaptateur choisi pour chaque échantillon doit être adapté avec le script suivant : Les séquences du "spacer" et de l'adaptateur ont été enlevées. Deuxièmement, Cutadapt a été utilisé pour supprimer la séquence terminale du transposon. Troisièmement, Cutadapt a été utilisé pour sélectionner les lectures totales et les lectures dans lesquelles la cassette rapporteuse avait été excisée. Ensuite l'information de la position pour chacun des sites *loxP* a été collectée avec le statut "recombinés". À partir des fichiers `samplename_totR1.fastq` et `samplename_recR1.fastq`, ont été éliminées les séquences de mauvaises qualités et celles plus courtes que 14 pb et plus longues que 24 pb. Enfin, le logiciel BWA a été utilisé pour l'alignement des séquences sur les génomes et stocké au format SAM. Les séquences

obtenues pour les souches MG 1655 ont été alignées sur le génome *E. coli* K12 MG1655 (NC_000913). L'analyse de l'activité de Cre, f_{exca} été calculé comme le rapport entre le nombre de sites SSR uniques sur une fenêtre de 10 ou 50 kbp autour de la position et le nombre total d'insertion de transposition dans cette fenêtre. Les profils Hi-SC2 ont été calculés à l'aide de MATLAB (Mathworks). Les scripts d'origines sont (Espinosa, Yamaichi, and Barre 2020). Leurs adaptations pour *E. coli* **Annexe 8 Scripts Hi-SC2 : conversion des .**

1.14 Microscopie

Préparation des lames de microscopie : Les bactéries ont été sur un matelas d'agarose 1% fondu dans du GTE. Au moment de l'observation, 130 μ l de GTE-Agarose sont déposés. 3 μ l de bactéries fixées ont été déposées. Les lames ont été conservées à 4°C. **Acquisition des images de microscopie.** Les images ont été réalisées sur le vidéo-microscope Zeiss Axio Observer, avec un objectif 63X PL-APO, NA 1.40 immersion à l'huile. Il est équipé d'une source de lumière blanche pour l'observation en contraste de phase (intensité 30% ; exposition 50 ms) et de LED pour l'observation en fluorescence. L'observation au DAPI a été utilisée une LED avec une longueur d'onde de 405 nm à 5% et une exposition de 10ms. L'acquisition des images a été effectuée grâce au logiciel ZEN et le traitement et l'analyse des images sur les logiciels Fiji et son application MicrobeJ. **Analyse des images.** Les images ont été traitées sur MicrobeJ pour la détection des bactéries et des nucléoïdes. Pour chaque expérience un minimum de 100 cellules. La détection des bactéries a été effectuée sur l'image en contraste de phase. Le modèle utilisé est Medial Axis (Length : Min 2 ; width : Max 1,1) ; et dans l'onglet Maxima, le modèle utilisé est Foci (Tolerance : 720 ; Z-score : 50). Nous avons utilisé Fiji pour quantifier la fluorescence du DAPI dans chaque bactérie, le seuil de fluorescence a été fixé à 4000 U.A. soit le minimum de fluorescence pour toutes les souches étudiées. La fluorescence du nucléoïde ou de la cellule entière est mesurée.

X. Bibliographie

- Abraham, Anil T., Jih-Jing Lin, Dianne L. Newton, Susanna Rybak, and Sidney M. Hecht. 2003. 'RNA Cleavage and Inhibition of Protein Synthesis by Bleomycin', *Chemistry & Biology*, 10: 45-52.
- Abremski, K., and R. Hoess. 1985. 'Phage P1 Cre-loxP site-specific recombination. Effects of DNA supercoiling on catenation and knotting of recombinant products', *J Mol Biol*, 184: 211-20.
- Ades, S. E. 2004. 'Proteolysis: Adaptor, adaptor, catch me a catch', *Curr Biol*, 14: R924-6.
- Akerlund, T., K. Nordstrom, and R. Bernander. 1995. 'Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 177: 6791-7.
- Arikan, E., M. S. Kulkarni, D. C. Thomas, and A. Sancar. 1986. 'Sequences of the *E. coli* *uvrB* gene and protein', *Nucleic Acids Res*, 14: 2637-50.
- Arthur, J. C., E. Perez-Chanona, M. Muhlbauer, S. Tomkovich, J. M. Uronis, T. J. Fan, B. J. Campbell, T. Abujamel, B. Dogan, A. B. Rogers, J. M. Rhodes, A. Stintzi, K. W. Simpson, J. J. Hansen, T. O. Keku, A. A. Fodor, and C. Jobin. 2012. 'Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota', *Science*, 338: 120-3.
- Asai, T., and T. Kogoma. 1994. 'D-loops and R-loops: alternative mechanisms for the initiation of chromosome replication in *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 176: 1807-12.
- Ashley, R. E., A. Dittmore, S. A. McPherson, C. L. Turnbough, Jr., K. C. Neuman, and N. Osheroff. 2017. 'Activities of gyrase and topoisomerase IV on positively supercoiled DNA', *Nucleic Acids Res*, 45: 9611-24.
- Avendaño, Carmen, and J. Carlos Menéndez. 2015. 'Anticancer Drugs That Interact with the DNA Minor Groove.' in, *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*.
- Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, and H. Mori. 2006. 'Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection', *Mol Syst Biol*, 2: 2006 0008.
- Bach, T., M. A. Krekling, and K. Skarstad. 2003. 'Excess SeqA prolongs sequestration of *oriC* and delays nucleoid segregation and cell division', *EMBO J*, 22: 315-23.
- Baharoglu, Z., and D. Mazel. 2014. 'SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions', *FEMS Microbiol Rev*, 38: 1126-45.
- Baker, T. A., and R. T. Sauer. 2012. 'ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine', *Biochim Biophys Acta*, 1823: 15-28.
- Balaban, N. Q., J. Merrin, R. Chait, L. Kowalik, and S. Leibler. 2004. 'Bacterial persistence as a phenotypic switch', *Science*, 305: 1622-5.

- Barbé, Jordi, Antonio Villaverde, and Ricardo Guerrero. 1987. 'Induction of the SOS response by hydroxyurea in *Escherichia coli* K12', *Mutation Research Letters*, 192: 105-08.
- Bass, P. D., D. A. Gubler, T. C. Judd, and R. M. Williams. 2013. 'Mitomycinoid alkaloids: mechanism of action, biosynthesis, total syntheses, and synthetic approaches', *Chem Rev*, 113: 6816-63.
- Behme, M. T., G. D. Lilley, and K. Ebisuzaki. 1976. 'Postinfection control by bacteriophage T4 of *Escherichia coli* recBC nuclease activity', *J Virol*, 18: 20-5.
- Beloin, C., A. Roux, and J. M. Ghigo. 2008. '*Escherichia coli* biofilms', *Curr Top Microbiol Immunol*, 322: 249-89.
- Bergerat, A., A. Kriebardis, and W. Guschlbauer. 1989. 'Preferential Site-specific Hemimethylation of GATC Sites in pBR322 DNA by Dam Methyltransferase from *Escherichia coli* ', *Journal of Biological Chemistry*, 264: 4064-70.
- Bernhardt, T. G., and P. A. de Boer. 2005. 'SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*', *Mol Cell*, 18: 555-64.
- Blazquez, J., J. M. Gomez-Gomez, A. Oliver, C. Juan, V. Kapur, and S. Martin. 2006. 'PBP3 inhibition elicits adaptive responses in *Pseudomonas aeruginosa*', *Mol Microbiol*, 62: 84-99.
- Bollinger, R. R., M. L. Everett, D. Palestrant, S. D. Love, S. S. Lin, and W. Parker. 2003. 'Human secretory immunoglobulin A may contribute to biofilm formation in the gut', *Immunology*, 109: 580-7.
- Bouet, J. Y., H. M. Krisch, and J. M. Louarn. 1998. 'Ndd, the bacteriophage T4 protein that disrupts the *Escherichia coli* nucleoid, has a DNA binding activity', *J Bacteriol*, 180: 5227-30.
- Boyce, R. P., and P. Howard-Flanders. 1964. 'Genetic Control of DNA Breakdown and Repair in *E. coli* K-12 Treated with Mitomycin C or Ultraviolet Light', *Z Vererbungsl*, 95: 345-50.
- Bradley, N. P., L. A. Washburn, P. P. Christov, C. M. H. Watanabe, and B. F. Eichman. 2020. '*Escherichia coli* YcaQ is a DNA glycosylase that unhooks DNA interstrand crosslinks', *Nucleic Acids Res*, 48: 7005-17.
- Brent, R., and M. Ptashne. 1981. 'Mechanism of action of the *lexA* gene product', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78: 4204-8.
- Bruschi, F., M. Dundar, P. B. Gahan, K. Gartland, M. Szente, M. P. Viola-Magni, and Y. Akbarova. 2011. 'Biotechnology worldwide and the 'European Biotechnology Thematic Network' Association (EBTNA)', *Curr Opin Biotechnol*, 22 Suppl 1: S7-14.
- Buljubasic, M., A. Hlevnjak, J. Repar, D. Dermic, V. Filic, I. Weber, K. Zahradka, and D. Zahradka. 2019. 'RecBCD- RecFOR-independent pathway of homologous recombination in *Escherichia coli*', *DNA Repair (Amst)*, 83: 102670.

- Buljubasic, M., J. Repar, K. Zahradka, D. Dermic, and D. Zahradka. 2012. 'RecF recombination pathway in *Escherichia coli* cells lacking RecQ, UvrD and HelD helicases', *DNA Repair (Amst)*, 11: 419-30.
- Burby, P. E., and L. A. Simmons. 2020. 'Regulation of Cell Division in Bacteria by Monitoring Genome Integrity and DNA Replication Status', *J Bacteriol*, 202.
- Burger, R. M., J. Peisach, and S. B. Horwitz. 1981. 'Activated bleomycin. A transient complex of drug, iron, and oxygen that degrades DNA', *Journal of Biological Chemistry*, 256: 11636-44.
- Buss, J., C. Coltharp, G. Shtengel, X. Yang, H. Hess, and J. Xiao. 2015. 'A multi-layered protein network stabilizes the *Escherichia coli* FtsZ-ring and modulates constriction dynamics', *PLoS Genet*, 11: e1005128.
- Cairns, John. 1963. 'The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography', *Journal of Molecular Biology*, 6: 208-IN5.
- Camberg, J. L., J. R. Hoskins, and S. Wickner. 2009. 'ClpXP protease degrades the cytoskeletal protein, FtsZ, and modulates FtsZ polymer dynamics', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 10614-9.
- Cejka, P. 2015. 'DNA End Resection: Nucleases Team Up with the Right Partners to Initiate Homologous Recombination', *J Biol Chem*, 290: 22931-8.
- Chang, D. E., D. J. Smalley, D. L. Tucker, M. P. Leatham, W. E. Norris, S. J. Stevenson, A. B. Anderson, J. E. Grissom, D. C. Laux, P. S. Cohen, and T. Conway. 2004. 'Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 7427-32.
- Chen, J., and J. Stubbe. 2005. 'Bleomycins: towards better therapeutics', *Nat Rev Cancer*, 5: 102-12.
- Chen, P., A. H. Michel, and J. Zhang. 2022. 'Transposon insertional mutagenesis of diverse yeast strains suggests coordinated gene essentiality polymorphisms', *Nat Commun*, 13: 1490.
- Cherepanov, Peter P., and Wilfried Wackernagel. 1995. 'Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant', *Gene*, 158: 9-14.
- Chiang, S. M., and H. E. Schellhorn. 2012. 'Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria', *Arch Biochem Biophys*, 525: 161-9.
- Chiang, Su L., and Eric J. Rubin. 2002. 'Construction of a mariner -based transposon for epitope-tagging and genomic targeting', *Gene*, 296: 179-85.

- Cirz, R. T., M. B. Jones, N. A. Gingles, T. D. Minogue, B. Jarrahi, S. N. Peterson, and F. E. Romesberg. 2007. 'Complete and SOS-mediated response of *Staphylococcus aureus* to the antibiotic ciprofloxacin', *J Bacteriol*, 189: 531-9.
- Claesson, M. J., I. B. Jeffery, S. Conde, S. E. Power, E. M. O'Connor, S. Cusack, H. M. Harris, M. Coakley, B. Lakshminarayanan, O. O'Sullivan, G. F. Fitzgerald, J. Deane, M. O'Connor, N. Harnedy, K. O'Connor, D. O'Mahony, D. van Sinderen, M. Wallace, L. Brennan, C. Stanton, J. R. Marchesi, A. P. Fitzgerald, F. Shanahan, C. Hill, R. P. Ross, and P. W. O'Toole. 2012. 'Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly', *Nature*, 488: 178-84.
- Clark, A. J. 1971. 'Toward a metabolic interpretation of genetic recombination of *E. coli* and its phages', *Annu Rev Microbiol*, 25: 437-64.
- . 1973. 'Recombination deficient mutants of *E. coli* and other bacteria', *Annu Rev Genet*, 7: 67-86.
- Clark, A. J., and A. D. Margulies. 1965. 'Isolation and Characterization of Recombination-Deficient Mutants of *Escherichia coli* K12', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 53: 451-9.
- Cole, S. T. 1983. 'Characterisation of the promoter for the LexA regulated *sulA* gene of *Escherichia coli*', *Mol Gen Genet*, 189: 400-4.
- Cooper, S., and C. E. Helmstetter. 1968. 'Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli* B/r', *J Mol Biol*, 31: 519-40.
- Courcelle, C. T., K. H. Chow, A. Casey, and J. Courcelle. 2006. 'Nascent DNA processing by RecJ favors lesion repair over translesion synthesis at arrested replication forks in *Escherichia coli*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 9154-9.
- Courcelle, J., and P. C. Hanawalt. 1999. 'RecQ and RecJ process blocked replication forks prior to the resumption of replication in UV-irradiated *Escherichia coli*', *Mol Gen Genet*, 262: 543-51.
- Courcelle, J., A. Khodursky, B. Peter, P. O. Brown, and P. C. Hanawalt. 2001. 'Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*', *Genetics*, 158: 41-64.
- Cox, M. M., and I. R. Lehman. 1981. 'recA protein of *Escherichia coli* promotes branch migration, a kinetically distinct phase of DNA strand exchange', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78: 3433-7.
- Crick, F. H., L. Barnett, S. Brenner, and R. J. Watts-Tobin. 1961. 'General nature of the genetic code for proteins', *Nature*, 192: 1227-32.
- Crooke, Stanley T., and William T. Bradner. 1976. 'Mitomycin C: a review', *Cancer Treatment Reviews*, 3: 121-39.
- Cupido, M., and B. A. Bridges. 1985. 'Uvr-independent repair of 8-methoxypsoralen crosslinks in *Escherichia coli*: evidence for a recombinational process', *Mutat Res*, 146: 135-41.

- Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. 'One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 6640-5.
- de Muinck, E. J., K. Lagesen, J. E. Afset, X. Didelot, K. S. Ronningen, K. Rudi, N. C. Stenseth, and P. Trosvik. 2013. 'Comparisons of infant *Escherichia coli* isolates link genomic profiles with adaptation to the ecological niche', *BMC Genomics*, 14: 81.
- Delgado, J. L., C. M. Hsieh, N. L. Chan, and H. Hiasa. 2018. 'Topoisomerases as anticancer targets', *Biochem J*, 475: 373-98.
- Dewachter, L., N. Verstraeten, M. Fauvart, and J. Michiels. 2018. 'An integrative view of cell cycle control in *Escherichia coli*', *FEMS Microbiol Rev*, 42: 116-36.
- Diederich, Ludger, Lene Juel Rasmussen, and Walter Messer. 1992. 'New cloning vectors for integration into the λ attachment site attB of the *Escherichia coli* chromosome', *Plasmid*, 28: 14-24.
- Dillingham, M. S., and S. C. Kowalczykowski. 2008. 'RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks', *Microbiol Mol Biol Rev*, 72: 642-71, Table of Contents.
- Dillon, S. C., and C. J. Dorman. 2010. 'Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression', *Nat Rev Microbiol*, 8: 185-95.
- Dobrindt, U., B. Hochhut, U. Hentschel, and J. Hacker. 2004. 'Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms', *Nat Rev Microbiol*, 2: 414-24.
- Domenech, P., H. Kobayashi, K. LeVier, G. C. Walker, and C. E. Barry, 3rd. 2009. 'BacA, an ABC transporter involved in maintenance of chronic murine infections with *Mycobacterium tuberculosis*', *J Bacteriol*, 191: 477-85.
- Doolittle, R. F., M. S. Johnson, I. Husain, B. Van Houten, D. C. Thomas, and A. Sancar. 1986. 'Domainal evolution of a prokaryotic DNA repair protein and its relationship to active-transport proteins', *Nature*, 323: 451-3.
- Dorr, T., M. Vulic, and K. Lewis. 2010. 'Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*', *PLoS Biol*, 8: e1000317.
- Downen, J. M., and R. A. Young. 2014. 'SMC complexes link gene expression and genome architecture', *Curr Opin Genet Dev*, 25: 131-7.
- Drablos, F., E. Feyzi, P. A. Aas, C. B. Vaagbo, B. Kavli, M. S. Bratlie, J. Pena-Diaz, M. Otterlei, G. Slupphaug, and H. E. Krokan. 2004. 'Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance', *DNA Repair (Amst)*, 3: 1389-407.
- Drake, J. W., B. Charlesworth, D. Charlesworth, and J. F. Crow. 1998. 'Rates of spontaneous mutation', *Genetics*, 148: 1667-86.
- Dronkert, M. L., and R. Kanaar. 2001. 'Repair of DNA interstrand cross-links', *Mutat Res*, 486: 217-47.

- Duigou, S., and F. Bocard. 2017. 'Long range chromosome organization in *Escherichia coli*: The position of the replication origin defines the non-structured regions and the Right and Left macrodomains', *PLoS Genet*, 13: e1006758.
- Dungrawala, H., and D. Cortez. 2015. 'Purification of proteins on newly synthesized DNA using iPOND', *Methods Mol Biol*, 1228: 123-31.
- Dunman, P. M., L. Ren, M. S. Rahman, V. A. Palejwala, H. S. Murphy, M. R. Volkert, and M. Z. Humayun. 2000. '*Escherichia coli* cells defective for the recN gene display constitutive elevation of mutagenesis at 3,N(4)-ethenocytosine via an SOS-induced mechanism', *Mol Microbiol*, 37: 680-6.
- Edelmann, D., F. H. Leinberger, N. E. Schmid, M. Oberpaul, T. F. Schaberle, and B. A. Berghoff. 2021. 'Elevated Expression of Toxin TisB Protects Persister Cells against Ciprofloxacin but Enhances Susceptibility to Mitomycin C', *Microorganisms*, 9.
- El Sayyed, H., L. Le Chat, E. Lebailly, E. Vickridge, C. Pages, F. Cornet, M. Cosentino Lagomarsino, and O. Espeli. 2016. 'Mapping Topoisomerase IV Binding and Activity Sites on the *E. coli* Genome', *PLoS Genet*, 12: e1006025.
- Epshtein, V., V. Kamarthapu, K. McGary, V. Svetlov, B. Ueberheide, S. Proshkin, A. Mironov, and E. Nudler. 2014. 'UvrD facilitates DNA repair by pulling RNA polymerase backwards', *Nature*, 505: 372-7.
- Escherich, T. 1988. 'The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1884', *Rev Infect Dis*, 10: 1220-5.
- Espeli, O., R. Borne, P. Dupaigne, A. Thiel, E. Gigant, R. Mercier, and F. Bocard. 2012. 'A MatP-divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in *E. coli*', *EMBO J*, 31: 3198-211.
- Espeli, O., R. Mercier, and F. Bocard. 2008. 'DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the *E. coli* chromosome', *Mol Microbiol*, 68: 1418-27.
- Espinosa, E., E. Paly, and F. X. Barre. 2020. 'High-Resolution Whole-Genome Analysis of Sister-Chromatid Contacts', *Mol Cell*, 79: 857-69 e3.
- Espinosa, E., Y. Yamaichi, and F. X. Barre. 2020. 'Protocol for High-Throughput Analysis of Sister-Chromatids Contacts', *STAR Protoc*, 1: 100202.
- Ezraty, B., A. Gennaris, F. Barras, and J. F. Collet. 2017. 'Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria', *Nat Rev Microbiol*, 15: 385-96.
- Fang, Q. 2013. 'DNA-protein crosslinks processed by nucleotide excision repair and homologous recombination with base and strand preference in *E. coli* model system', *Mutat Res*, 741-742: 1-10.
- Feeney, A. R., E. M. Cooke, and R. Shinebaum. 1980. 'A comparative study of gram-negative aerobic bacilli in the faeces of babies born in hospital and at home', *J Hyg (Lond)*, 84: 91-6.

- Fernandez De Henestrosa, A. R., T. Ogi, S. Aoyagi, D. Chafin, J. J. Hayes, H. Ohmori, and R. Woodgate. 2000. 'Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*', *Mol Microbiol*, 35: 1560-72.
- Finch, P. W., P. Chambers, and P. T. Emmerson. 1985. 'Identification of the *Escherichia coli* recN gene product as a major SOS protein', *J Bacteriol*, 164: 653-8.
- Fisher, J. K., A. Bourniquel, G. Witz, B. Weiner, M. Prentiss, and N. Kleckner. 2013. 'Four-dimensional imaging of *E. coli* nucleoid organization and dynamics in living cells', *Cell*, 153: 882-95.
- Friedman, N., S. Vardi, M. Ronen, U. Alon, and J. Stavans. 2005. 'Precise temporal modulation in the response of the SOS DNA repair network in individual bacteria', *PLoS Biol*, 3: e238.
- Fuchs, R. P. 2016. 'Tolerance of lesions in *E. coli*: Chronological competition between Translesion Synthesis and Damage Avoidance', *DNA Repair (Amst)*, 44: 51-58.
- Gatignol, Anne, Henri Durand, and Gérard Tiraby. 1988. 'Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein', *FEBS Letters*, 230: 171-75.
- Gause, G. F. 1963. 'Microorganisms and the Molecular Biology of Cancer.' in, *Advances in Applied Microbiology Volume 5*.
- Ghodke, H., H. N. Ho, and A. M. van Oijen. 2020. 'Single-molecule live-cell imaging visualizes parallel pathways of prokaryotic nucleotide excision repair', *Nat Commun*, 11: 1477.
- Ghodke, H., B. P. Paudel, J. S. Lewis, S. Jergic, K. Gopal, Z. J. Romero, E. A. Wood, R. Woodgate, M. M. Cox, and A. M. van Oijen. 2019. 'Spatial and temporal organization of RecA in the *Escherichia coli* DNA-damage response', *Elife*, 8.
- Gibson, B., D. J. Wilson, E. Feil, and A. Eyre-Walker. 2018. 'The distribution of bacterial doubling times in the wild', *Proc Biol Sci*, 285.
- Gibson, F. P., D. R. Leach, and R. G. Lloyd. 1992. 'Identification of sbcD mutations as cosuppressors of recBC that allow propagation of DNA palindromes in *Escherichia coli* K-12', *J Bacteriol*, 174: 1222-8.
- Godoy, V. G., D. F. Jarosz, F. L. Walker, L. A. Simmons, and G. C. Walker. 2006. 'Y-family DNA polymerases respond to DNA damage-independent inhibition of replication fork progression', *EMBO J*, 25: 868-79.
- Gogou, C., A. Japaridze, and C. Dekker. 2021. 'Mechanisms for Chromosome Segregation in Bacteria', *Front Microbiol*, 12: 685687.
- Goldberg, Irving H. 1965. 'Mode of action of antibiotics', *The American Journal of Medicine*, 39: 722-52.

- Gonzaga, E. R. 2009. 'Role of UV light in photodamage, skin aging, and skin cancer: importance of photoprotection', *Am J Clin Dermatol*, 10 Suppl 1: 19-24.
- Gottesman, S., E. Roche, Y. Zhou, and R. T. Sauer. 1998. 'The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system', *Genes Dev*, 12: 1338-47.
- Graumann, P. L., and T. Knust. 2009. 'Dynamics of the bacterial SMC complex and SMC-like proteins involved in DNA repair', *Chromosome Res*, 17: 265-75.
- Griffin, P. M., and R. V. Tauxe. 1991. 'The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome', *Epidemiol Rev*, 13: 60-98.
- Grompone, G., V. Bidnenko, S. D. Ehrlich, and B. Michel. 2004. 'PriA is essential for viability of the *Escherichia coli* topoisomerase IV parE10(Ts) mutant', *J Bacteriol*, 186: 1197-9.
- Guarne, A., T. Brendler, Q. Zhao, R. Ghirlando, S. Austin, and W. Yang. 2005. 'Crystal structure of a SeqA-N filament: implications for DNA replication and chromosome organization', *EMBO J*, 24: 1502-11.
- Gullbrand, B., and K. Nordstrom. 2000. 'FtsZ ring formation without subsequent cell division after replication runout in *Escherichia coli*', *Mol Microbiol*, 36: 1349-59.
- Guzman-Soto, I., C. McTiernan, M. Gonzalez-Gomez, A. Ross, K. Gupta, E. J. Suuronen, T. F. Mah, M. Griffith, and E. I. Alarcon. 2021. 'Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in in vitro and in vivo biofilm models', *iScience*, 24: 102443.
- Hagstrom, K. A., and B. J. Meyer. 2003. 'Condensin and cohesin: more than chromosome compactor and glue', *Nat Rev Genet*, 4: 520-34.
- Hamilton, D. L., and K. Abremski. 1984. 'Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites', *J Mol Biol*, 178: 481-6.
- Han, E. S., D. L. Cooper, N. S. Persky, V. A. Suttera, Jr., R. D. Whitaker, M. L. Montello, and S. T. Lovett. 2006. 'RecJ exonuclease: substrates, products and interaction with SSB', *Nucleic Acids Res*, 34: 1084-91.
- Hanada, K., T. Ukita, Y. Kohno, K. Saito, J. Kato, and H. Ikeda. 1997. 'RecQ DNA helicase is a suppressor of illegitimate recombination in *Escherichia coli*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 3860-5.
- Hanawalt, P. C. 2002. 'Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation', *Oncogene*, 21: 8949-56.
- Harmon, Frank G., Russell J. DiGate, and Stephen C. Kowalczykowski. 1999. 'RecQ Helicase and Topoisomerase III Comprise a Novel DNA Strand Passage Function', *Molecular Cell*, 3: 611-20.

- Harshey, R. M. 2003. 'Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal', *Annu Rev Microbiol*, 57: 249-73.
- Hata, Tōju, Yoshimoto Sano, Ryōzō Sugawara, Akihiro Matsumae, Kōkichi Kanamori, Tatsuo Shima, and Tadashi Hoshi. 1956. 'Mitomycin, a New Antibiotic From Streptomyces. I', *The Journal of Antibiotics, Series A*, 9: 141-46.
- Helleday, T., E. Petermann, C. Lundin, B. Hodgson, and R. A. Sharma. 2008. 'DNA repair pathways as targets for cancer therapy', *Nat Rev Cancer*, 8: 193-204.
- Henrikus, S. S., A. M. van Oijen, and A. Robinson. 2018. 'Specialised DNA polymerases in *Escherichia coli*: roles within multiple pathways', *Curr Genet*, 64: 1189-96.
- Hiasa, H., D. O. Yousef, and K. J. Marians. 1996. 'DNA strand cleavage is required for replication fork arrest by a frozen topoisomerase-quinolone-DNA ternary complex', *J Biol Chem*, 271: 26424-9.
- Hillion, M., and H. Antelmann. 2015. 'Thiol-based redox switches in prokaryotes', *Biol Chem*, 396: 415-44.
- Hirano, T. 2005. 'SMC proteins and chromosome mechanics: from bacteria to humans', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360: 507-14.
- Holick, Michael F. 1987. 'Skin as the Site of Vitamin D Synthesis and Target Tissue for 1,25-Dihydroxyvitamin D₃', *Archives of Dermatology*, 123.
- Holmes, Chris E., Robert J. Duff, Gijs A. van der Marel, Jacques van Boom, and Sidney M. Hecht. 1997. 'On the chemistry of RNA degradation by Fe-bleomycin', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 5: 1235-48.
- Hong, X., G. W. Cadwell, and T. Kogoma. 1995. '*Escherichia coli* RecG and RecA proteins in R-loop formation', *The EMBO Journal*, 14: 2385-92.
- Horii, Zen-ichiro, and Alvin J. Clark. 1973. 'Genetic analysis of the recF pathway to genetic recombination in *Escherichia coli* k12: Isolation and characterization of mutants', *Journal of Molecular Biology*, 80: 327-44.
- Houten, Bennett Van. 1986. 'Action mechanism of ABC excision nuclease on a DNA substrate containing a psoralen crosslink at a defined position'.
- Howard-Flanders, P., and L. Theriot. 1966. 'Mutants of *Escherichia coli* K-12 defective in DNA repair and in genetic recombination', *Genetics*, 53: 1137-50.
- Huisman, O., R. D'Ari, and S. Gottesman. 1984. 'Cell-division control in *Escherichia coli*: specific induction of the SOS function SfiA protein is sufficient to block septation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81: 4490-4.
- Imlay, J. A. 2003. 'Pathways of oxidative damage', *Annu Rev Microbiol*, 57: 395-418.

- Iyer, V. N., and W. Szybalski. 1963. 'A Molecular Mechanism of Mitomycin Action: Linking of Complementary DNA Strands', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 50: 355-62.
- . 1964. 'Mitomycins and Porfiromycin: Chemical Mechanism of Activation and Cross-Linking of DNA', *Science*, 145: 55-8.
- Jacoby, G. A. 2005. 'Mechanisms of resistance to quinolones', *Clin Infect Dis*, 41 Suppl 2: S120-6.
- Joseph, A. M., S. Daw, I. Sadhir, and A. Badrinarayanan. 2021. 'Coordination between nucleotide excision repair and specialized polymerase DnaE2 action enables DNA damage survival in non-replicating bacteria', *Elife*, 10.
- Joshi, M. C., D. Magnan, T. P. Montminy, M. Lies, N. Stepankiw, and D. Bates. 2013. 'Regulation of sister chromosome cohesion by the replication fork tracking protein SeqA', *PLoS Genet*, 9: e1003673.
- Jun, S., and B. Mulder. 2006. 'Entropy-driven spatial organization of highly confined polymers: lessons for the bacterial chromosome', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 12388-93.
- Junier, I., F. Boccard, and O. Espeli. 2014. 'Polymer modeling of the *E. coli* genome reveals the involvement of locus positioning and macrodomain structuring for the control of chromosome conformation and segregation', *Nucleic Acids Res*, 42: 1461-73.
- Kaas, R. S., C. Friis, D. W. Ussery, and F. M. Aarestrup. 2012. 'Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes', *BMC Genomics*, 13: 577.
- Kamada, K., and D. Barilla. 2018. 'Combing Chromosomal DNA Mediated by the SMC Complex: Structure and Mechanisms', *Bioessays*, 40.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley. 2004. 'Pathogenic *Escherichia coli*', *Nat Rev Microbiol*, 2: 123-40.
- Kasarjian, J. K., M. Iida, and J. Ryu. 2003. 'New restriction enzymes discovered from *Escherichia coli* clinical strains using a plasmid transformation method', *Nucleic Acids Res*, 31: e22.
- Katayama-Fujimura, Y., S. Gottesman, and M. R. Maurizi. 1987. 'A multiple-component, ATP-dependent protease from *Escherichia coli*', *Journal of Biological Chemistry*, 262: 4477-85.
- Keck, M. V., and S. M. Hecht. 1995. 'Sequence-specific hydrolysis of yeast tRNA(Phe) mediated by metal-free bleomycin', *Biochemistry*, 34: 12029-37.
- Kelman, L. M., and Z. Kelman. 2004. 'Multiple origins of replication in archaea', *Trends Microbiol*, 12: 399-401.
- Kelner, A. 1949. 'Photoreactivation of Ultraviolet-Irradiated *Escherichia coli*, with Special Reference to the Dose-Reduction Principle and to Ultraviolet-Induced Mutation', *J Bacteriol*, 58: 511-22.

- Kenyon, C. J., and G. C. Walker. 1981. 'Expression of the *E. coli* *uvrA* gene is inducible', *Nature*, 289: 808-10.
- Keyamura, K., and T. Hishida. 2019. 'Topological DNA-binding of structural maintenance of chromosomes-like RecN promotes DNA double-strand break repair in *Escherichia coli*', *Commun Biol*, 2: 413.
- Keyamura, K., C. Sakaguchi, Y. Kubota, H. Niki, and T. Hishida. 2013. 'RecA protein recruits structural maintenance of chromosomes (SMC)-like RecN protein to DNA double-strand breaks', *J Biol Chem*, 288: 29229-37.
- Khatoun, J., R. P. Rai, and K. N. Prasad. 2016. 'Role of *Helicobacter pylori* in gastric cancer: Updates', *World J Gastrointest Oncol*, 8: 147-58.
- Khodursky, A. B., and N. R. Cozzarelli. 1998. 'The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials', *J Biol Chem*, 273: 27668-77.
- Khodursky, A. B., B. J. Peter, M. B. Schmid, J. DeRisi, D. Botstein, P. O. Brown, and N. R. Cozzarelli. 2000. 'Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of DNA microarrays', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 9419-24.
- Kidane, D., H. Sanchez, J. C. Alonso, and P. L. Graumann. 2004. 'Visualization of DNA double-strand break repair in live bacteria reveals dynamic recruitment of *Bacillus subtilis* RecF, RecO and RecN proteins to distinct sites on the nucleoids', *Mol Microbiol*, 52: 1627-39.
- Kim, H., and J. J. Loparo. 2016. 'Multistep assembly of DNA condensation clusters by SMC', *Nat Commun*, 7: 10200.
- Kisker, C., J. Kuper, and B. Van Houten. 2013. 'Prokaryotic nucleotide excision repair', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5: a012591.
- Kleibl, K. 2002. 'Molecular mechanisms of adaptive response to alkylating agents in *Escherichia coli* and some remarks on O6-methylguanine DNA-methyltransferase in other organisms', *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 512: 67-84.
- Klimova, A. N., and S. J. Sandler. 2020. 'An Epistasis Analysis of *recA* and *recN* in *Escherichia coli* K-12', *Genetics*, 216: 381-93.
- Kosa, J. L., Z. Z. Zdraveski, S. Currier, M. G. Marinus, and J. M. Essigmann. 2004. 'RecN and RecG are required for *Escherichia coli* survival of Bleomycin-induced damage', *Mutat Res*, 554: 149-57.
- Kouzminova, E. A., and A. Kuzminov. 2004. 'Chromosomal fragmentation in dUTPase-deficient mutants of *Escherichia coli* and its recombinational repair', *Mol Microbiol*, 51: 1279-95.
- Kow, Y. W. 1994. 'Base excision repair in *E. coli*--an overview', *Ann N Y Acad Sci*, 726: 178-80.

- Kowalczykowski, S. C., D. A. Dixon, A. K. Eggleston, S. D. Lauder, and W. M. Rehrauer. 1994. 'Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*', *Microbiol Rev*, 58: 401-65.
- Kowalczykowski, Stephen C., Jennifer Clow, Rahul Somani, and Abraham Varghese. 1987. 'Effects of the *Escherichia coli* SSB protein on the binding of *Escherichia coli* RecA protein to single-stranded DNA', *Journal of Molecular Biology*, 193: 81-95.
- Kraithong, T., S. Hartley, D. Jeruzalmi, and D. Pakotiprapha. 2021. 'A Peek Inside the Machines of Bacterial Nucleotide Excision Repair', *Int J Mol Sci*, 22.
- Kraithong, T., J. Sucharitakul, C. Buranachai, D. Jeruzalmi, P. Chaiyen, and D. Pakotiprapha. 2021. 'Real-time investigation of the roles of ATP hydrolysis by UvrA and UvrB during DNA damage recognition in nucleotide excision repair', *DNA Repair (Amst)*, 97: 103024.
- Lauret, L., J. Demol, R. P. Fuchs, and V. Pages. 2015. 'Bacterial Proliferation: Keep Dividing and Don't Mind the Gap', *PLoS Genet*, 11: e1005757.
- Lawrence, J. G., and J. R. Roth. 1996. 'Evolution of coenzyme B12 synthesis among enteric bacteria: evidence for loss and reacquisition of a multigene complex', *Genetics*, 142: 11-24.
- Leach, D. R., E. A. Okely, and D. J. Pinder. 1997. 'Repair by recombination of DNA containing a palindromic sequence', *Mol Microbiol*, 26: 597-606.
- Lehman, I. R., and A. L. Nussbaum. 1964. 'The Deoxyribonucleases of *Escherichia coli*', *Journal of Biological Chemistry*, 239: 2628-36.
- Leimbach, A., J. Hacker, and U. Dobrindt. 2013. '*E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity', *Curr Top Microbiol Immunol*, 358: 3-32.
- Lenhart, J. S., E. R. Brandes, J. W. Schroeder, R. J. Sorenson, H. D. Showalter, and L. A. Simmons. 2014. 'RecO and RecR are necessary for RecA loading in response to DNA damage and replication fork stress', *J Bacteriol*, 196: 2851-60.
- Lesterlin, C., G. Ball, L. Schermelleh, and D. J. Sherratt. 2014. 'RecA bundles mediate homology pairing between distant sisters during DNA break repair', *Nature*, 506: 249-53.
- Lesterlin, C., E. Gigant, F. Boccard, and O. Espeli. 2012. 'Sister chromatid interactions in bacteria revealed by a site-specific recombination assay', *EMBO J*, 31: 3468-79.
- Lewis, K. 2010. 'Persister cells', *Annu Rev Microbiol*, 64: 357-72.
- Li, X., and W. D. Heyer. 2008. 'Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance', *Cell Res*, 18: 99-113.
- Lin, L. L., and J. W. Little. 1988. 'Isolation and characterization of noncleavable (Ind-) mutants of the LexA repressor of *Escherichia coli* K-12', *J Bacteriol*, 170: 2163-73.

- Lindahl, T., B. Sedgwick, M. Sekiguchi, and Y. Nakabeppu. 1988. 'Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents', *Annu Rev Biochem*, 57: 133-57.
- Lloyd. 1983. 'Inducible Expression of a Gene Specific to the RecF Pathway for Recombination in *Escherichia coli* K12'.
- Little, J. W., and D. W. Mount. 1982. 'The SOS regulatory system of *Escherichia coli*', *Cell*, 29: 11-22.
- Liu, B., M. L. Wong, R. L. Tinker, E. P. Geiduschek, and B. M. Alberts. 1993. 'The DNA replication fork can pass RNA polymerase without displacing the nascent transcript', *Nature*, 366: 33-9.
- Liu, J., R. Lee, B. M. Britton, J. A. London, K. Yang, J. Hanne, J. B. Lee, and R. Fishel. 2019. 'MutL sliding clamps coordinate exonuclease-independent *Escherichia coli* mismatch repair', *Nat Commun*, 10: 5294.
- Lopes-Kulishev, C. O., I. R. Alves, E. Y. Valencia, M. I. Pidhirnyj, F. S. Fernandez-Silva, T. R. Rodrigues, C. R. Guzzo, and R. S. Galhardo. 2015. 'Functional characterization of two SOS-regulated genes involved in mitomycin C resistance in *Caulobacter crescentus*', *DNA Repair (Amst)*, 33: 78-89.
- Lovett, S. T., and A. J. Clark. 1984. 'Genetic analysis of the recJ gene of *Escherichia coli* K-12', *J Bacteriol*, 157: 190-6.
- Lovett, S. T., and R. D. Kolodner. 1989. 'Identification and purification of a single-stranded-DNA-specific exonuclease encoded by the recJ gene of *Escherichia coli*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 2627-31.
- Lu, M., J. L. Campbell, E. Boye, and N. Kleckner. 1994. 'SeqA: a negative modulator of replication initiation in *E. coli*', *Cell*, 77: 413-26.
- Lusetti, S. L., and M. M. Cox. 2002. 'The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks', *Annu Rev Biochem*, 71: 71-100.
- Magliozzo, R. S., J. Peisach, and M. R. Ciriolo. 1989. 'Transfer-Rna Is Cleaved by Activated Bleomycin', *Molecular Pharmacology*, 35: 428-32.
- Makovets, S., L. M. Powell, A. J. Titheradge, G. W. Blakely, and N. E. Murray. 2004. 'Is modification sufficient to protect a bacterial chromosome from a resident restriction endonuclease?', *Mol Microbiol*, 51: 135-47.
- Margolin, W. 2005. 'FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 862-71.
- Mascarenhas, J., H. Sanchez, S. Tadesse, D. Kidane, M. Krisnamurthy, J. C. Alonso, and P. L. Graumann. 2006. '*Bacillus subtilis* SbcC protein plays an important role in DNA inter-strand cross-link repair', *BMC Mol Biol*, 7: 20.

- Maslowska, K. H., K. Makiela-Dzbenka, and I. J. Fijalkowska. 2019. 'The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage', *Environ Mol Mutagen*, 60: 368-84.
- Massoni, S. C., M. C. Leeson, J. E. Long, K. Gemme, A. Mui, and S. J. Sandler. 2012. 'Factors limiting SOS expression in log-phase cells of *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 194: 5325-33.
- McKenzie, G. J., R. S. Harris, P. L. Lee, and S. M. Rosenberg. 2000. 'The SOS response regulates adaptive mutation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 6646-51.
- McLean, E. K., J. S. Lenhart, and L. A. Simmons. 2021. 'RecA Is Required for the Assembly of RecN into DNA Repair Complexes on the Nucleoid', *J Bacteriol*, 203: e0024021.
- Meddows, T. R., A. P. Savory, J. I. Grove, T. Moore, and R. G. Lloyd. 2005. 'RecN protein and transcription factor DksA combine to promote faithful recombinational repair of DNA double-strand breaks', *Mol Microbiol*, 57: 97-110.
- Mellon, I., and P. C. Hanawalt. 1989. 'Induction of the *Escherichia coli* lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand', *Nature*, 342: 95-8.
- Mercier, R., M. A. Petit, S. Schbath, S. Robin, M. El Karoui, F. Boccard, and O. Espeli. 2008. 'The MatP/matS site-specific system organizes the terminus region of the *E. coli* chromosome into a macrodomain', *Cell*, 135: 475-85.
- Merrih, H., Y. Zhang, A. D. Grossman, and J. D. Wang. 2012. 'Replication-transcription conflicts in bacteria', *Nat Rev Microbiol*, 10: 449-58.
- Meselson, M., and F. W. Stahl. 1958. 'The Replication of DNA in *Escherichia coli*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 44: 671-82.
- Messer, W. 2002. 'The bacterial replication initiator DnaA. DnaA and oriC, the bacterial mode to initiate DNA replication', *FEMS Microbiol Rev*, 26: 355-74.
- Michel, B., H. Boubakri, Z. Baharoglu, M. LeMasson, and R. Lestini. 2007. 'Recombination proteins and rescue of arrested replication forks', *DNA Repair (Amst)*, 6: 967-80.
- Michel, B., A. K. Sinha, and D. R. F. Leach. 2018. 'Replication Fork Breakage and Restart in *Escherichia coli*', *Microbiol Mol Biol Rev*, 82.
- Mielecki, D., and E. Grzesiuk. 2014. 'Ada response - a strategy for repair of alkylated DNA in bacteria', *FEMS Microbiol Lett*, 355: 1-11.
- Molinier, J., E. J. Oakeley, O. Niederhauser, I. Kovalchuk, and B. Hohn. 2005. 'Dynamic response of plant genome to ultraviolet radiation and other genotoxic stresses', *Mutat Res*, 571: 235-47.
- Moolenaar, G. F., S. van Rossum-Fikkert, M. van Kesteren, and N. Goosen. 2002. 'Cho, a second endonuclease involved in *Escherichia coli* nucleotide excision repair', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 1467-72.

- Mori, T., S. Mizuta, H. Suenaga, and K. Miyazaki. 2008. 'Metagenomic screening for bleomycin resistance genes', *Appl Environ Microbiol*, 74: 6803-5.
- Nagashima, K., Y. Kubota, T. Shibata, C. Sakaguchi, H. Shinagawa, and T. Hishida. 2006. 'Degradation of *Escherichia coli* RecN aggregates by ClpXP protease and its implications for DNA damage tolerance', *J Biol Chem*, 281: 30941-6.
- Naiman, K., G. Philippin, R. P. Fuchs, and V. Pages. 2014. 'Chronology in lesion tolerance gives priority to genetic variability', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 5526-31.
- Nakayama, K., N. Irino, and H. Nakayama. 1985. 'The recQ gene of *Escherichia coli* K12: molecular cloning and isolation of insertion mutants', *Mol Gen Genet*, 200: 266-71.
- Nasmyth, K., and C. H. Haering. 2005. 'The structure and function of SMC and kleisin complexes', *Annu Rev Biochem*, 74: 595-648.
- Neher, S. B., J. M. Flynn, R. T. Sauer, and T. A. Baker. 2003. 'Latent ClpX-recognition signals ensure LexA destruction after DNA damage', *Genes Dev*, 17: 1084-9.
- Neher, S. B., J. Villen, E. C. Oakes, C. E. Bakalarski, R. T. Sauer, S. P. Gygi, and T. A. Baker. 2006. 'Proteomic profiling of ClpXP substrates after DNA damage reveals extensive instability within SOS regulon', *Mol Cell*, 22: 193-204.
- Nielsen, H. J., Y. Li, B. Youngren, F. G. Hansen, and S. Austin. 2006. 'Progressive segregation of the *Escherichia coli* chromosome', *Mol Microbiol*, 61: 383-93.
- Nielsen, H. J., B. Youngren, F. G. Hansen, and S. Austin. 2007. 'Dynamics of *Escherichia coli* chromosome segregation during multifork replication', *J Bacteriol*, 189: 8660-6.
- Nirenberg, M., P. Leder, M. Bernfield, R. Brimacombe, J. Trupin, F. Rottman, and C. O'Neal. 1965. 'RNA codewords and protein synthesis, VII. On the general nature of the RNA code', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 53: 1161-8.
- Nolivos, S., and D. Sherratt. 2014. 'The bacterial chromosome: architecture and action of bacterial SMC and SMC-like complexes', *FEMS Microbiol Rev*, 38: 380-92.
- Noll, D. M., T. M. Mason, and P. S. Miller. 2006. 'Formation and repair of interstrand cross-links in DNA', *Chem Rev*, 106: 277-301.
- O'Reilly, E. K., and K. N. Kreuzer. 2004. 'Isolation of SOS constitutive mutants of *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 186: 7149-60.
- Odsbu, I., and K. Skarstad. 2014. 'DNA compaction in the early part of the SOS response is dependent on RecN and RecA', *Microbiology (Reading)*, 160: 872-82.
- Oomen, M. E., A. K. Hedger, J. K. Watts, and J. Dekker. 2020. 'Detecting chromatin interactions between and along sister chromatids with SisterC', *Nat Methods*, 17: 1002-09.

- Pages, V. 2016. 'Single-strand gap repair involves both RecF and RecBCD pathways', *Curr Genet*, 62: 519-21.
- Pakotiprapha, D., Y. Liu, G. L. Verdine, and D. Jeruzalmi. 2009. 'A structural model for the damage-sensing complex in bacterial nucleotide excision repair', *J Biol Chem*, 284: 12837-44.
- Palchevskiy, V., and S. E. Finkel. 2009. 'A role for single-stranded exonucleases in the use of DNA as a nutrient', *J Bacteriol*, 191: 3712-6.
- Paulsen, V. S., M. Mardirossian, H. M. Blencke, M. Benincasa, G. Runti, M. Nepa, T. Haug, K. Stensvag, and M. Scocchi. 2016. 'Inner membrane proteins YgdD and SbmA are required for the complete susceptibility of *Escherichia coli* to the proline-rich antimicrobial peptide arasin 1(1-25)', *Microbiology (Reading)*, 162: 601-09.
- Pellegrino, S., J. Radzimanowski, D. de Sanctis, E. Boeri Erba, S. McSweeney, and J. Timmins. 2012. 'Structural and functional characterization of an SMC-like protein RecN: new insights into double-strand break repair', *Structure*, 20: 2076-89.
- Persky, N. S., and S. T. Lovett. 2008. 'Mechanisms of recombination: lessons from *E. coli*', *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 43: 347-70.
- Peter, B. J., J. Arsuaga, A. M. Breier, A. B. Khodursky, P. O. Brown, and N. R. Cozzarelli. 2004. 'Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*', *Genome Biol*, 5: R87.
- Petrelli, F., M. Ghidini, A. Ghidini, G. Perego, M. Cabiddu, S. Khakoo, E. Oggionni, C. Abeni, J. C. Hahne, G. Tomasello, and A. Zaniboni. 2019. 'Use of Antibiotics and Risk of Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies', *Cancers (Basel)*, 11.
- Picksley, S. M., P. V. Attfield, and R. G. Lloyd. 1984. 'Repair of DNA double-strand breaks in *Escherichia coli* K12 requires a functional recN product', *Mol Gen Genet*, 195: 267-74.
- Picksley, S. M., S. J. Morton, and R. G. Lloyd. 1985. 'The recN locus of *Escherichia coli* K12: molecular analysis and identification of the gene product', *Mol Gen Genet*, 201: 301-7.
- Poirel, L., J. Y. Madec, A. Lupo, A. K. Schink, N. Kieffer, P. Nordmann, and S. Schwarz. 2018. 'Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*', *Microbiol Spectr*, 6.
- Postow, L., N. J. Crisona, B. J. Peter, C. D. Hardy, and N. R. Cozzarelli. 2001. 'Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 8219-26.
- Pupo, G. M., R. Lan, and P. R. Reeves. 2000. 'Multiple independent origins of Shigella clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 10567-72.
- Radman, M. 1975. 'SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis', *Basic Life Sci*, 5A: 355-67.

- Raskin, D. M., and P. A. de Boer. 1999. 'MinDE-dependent pole-to-pole oscillation of division inhibitor MinC in *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 181: 6419-24.
- Reid, B. G., W. A. Fenton, A. L. Horwich, and E. U. Weber-Ban. 2001. 'ClpA mediates directional translocation of substrate proteins into the ClpP protease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 3768-72.
- Rempel, S., C. Gati, M. Nijland, C. Thangaratnarajah, A. Karyolaimos, J. W. de Gier, A. Guskov, and D. J. Slotboom. 2020. 'A mycobacterial ABC transporter mediates the uptake of hydrophilic compounds', *Nature*, 580: 409-12.
- Reyes, E. D., P. L. Patidar, L. A. Uranga, A. S. Bortoletto, and S. L. Lusetti. 2010. 'RecN is a cohesin-like protein that stimulates intermolecular DNA interactions in vitro', *J Biol Chem*, 285: 16521-9.
- Robert G. Lloyd, Martin C. Porton, and Carol Buckman. 1988. 'Effect of recF, recD, recN, recO and ruv mutations on ultraviolet survival and genetic recombination in arecD strain of *Escherichia coli* K12'.
- Robinson, A., and A. M. van Oijen. 2013. 'Bacterial replication, transcription and translation: mechanistic insights from single-molecule biochemical studies', *Nat Rev Microbiol*, 11: 303-15.
- Rosignol, M., L. Moulin, and F. Boccard. 2002. 'Phage HK022-based integrative vectors for the insertion of genes in the chromosome of multiply marked *Escherichia coli* strains', *FEMS Microbiol Lett*, 213: 45-9.
- Rostas, K., S. J. Morton, S. M. Picksley, and R. G. Lloyd. 1987. 'Nucleotide sequence and LexA regulation of the *Escherichia coli* recN gene', *Nucleic Acids Res*, 15: 5041-9.
- Rudolph, C. J., A. L. Upton, A. Stockum, C. A. Nieduszynski, and R. G. Lloyd. 2013. 'Avoiding chromosome pathology when replication forks collide', *Nature*, 500: 608-11.
- Rupert, C. S., S. H. Goodgal, and R. M. Herriott. 1958. 'Photoreactivation in vitro of ultraviolet-inactivated *Hemophilus influenzae* transforming factor', *J Gen Physiol*, 41: 451-71.
- Russo, T. 2003. 'Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem', *Microbes and Infection*, 5: 449-56.
- Sancar, G. B., F. W. Smith, and A. Sancar. 1983. 'Identification and amplification of the *E. coli* phr gene product', *Nucleic Acids Res*, 11: 6667-78.
- Sancar, Gwendolyn B., Aziz Sancar, John W. Little, and W. Dean Rupp. 1982. 'The uvrB gene of *Escherichia coli* has both lexA-repressed and lexA-independent promoters', *Cell*, 28: 523-30.
- Sanchez, H., and J. C. Alonso. 2005. '*Bacillus subtilis* RecN binds and protects 3'-single-stranded DNA extensions in the presence of ATP', *Nucleic Acids Res*, 33: 2343-50.

- Santos, A. L., V. Oliveira, I. Baptista, I. Henriques, N. C. Gomes, A. Almeida, A. Correia, and A. Cunha. 2013. 'Wavelength dependence of biological damage induced by UV radiation on bacteria', *Arch Microbiol*, 195: 63-74.
- Sargentini, N. J., and K. C. Smith. 1986. 'Quantitation of the involvement of the recA, recB, recC, recF, recJ, recN, lexA, radA, radB, uvrD, and umuC genes in the repair of X-ray-induced DNA double-strand breaks in *Escherichia coli*', *Radiat Res*, 107: 58-72.
- . 1988. 'Genetic and phenotypic analyses indicating occurrence of the recN262 and radB101 mutations at the same locus in *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 170: 2392-4.
- Savageau, Michael A. 1983. '*Escherichia coli* Habitats, Cell Types, and Molecular Mechanisms of Gene Control', *The American Naturalist*, 122: 732-44.
- Schalow, B. J., C. T. Courcelle, and J. Courcelle. 2011. '*Escherichia coli* Fpg glycosylase is nonredundant and required for the rapid global repair of oxidized purine and pyrimidine damage in vivo', *J Mol Biol*, 410: 183-93.
- Seeberg, E. 1978. 'Reconstitution of an *Escherichia coli* repair endonuclease activity from the separated uvrA+ and uvrB+/uvrC+ gene products', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75: 2569-73.
- Seeberg, Erling, Lars Eide, and Magnar Bjørås. 1995. 'The base excision repair pathway', *Trends in Biochemical Sciences*, 20: 391-97.
- Setlow, R. B., and W. L. Carrier. 1964. 'The Disappearance of Thymine Dimers from DNA: An Error-Correcting Mechanism', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 51: 226-31.
- Sharples, G. J., and D. R. Leach. 1995. 'Structural and functional similarities between the SbcCD proteins of *Escherichia coli* and the RAD50 and MRE11 (RAD32) recombination and repair proteins of yeast', *Mol Microbiol*, 17: 1215-7.
- Shen, P., and H. V. Huang. 1986. 'Homologous recombination in *Escherichia coli*: dependence on substrate length and homology', *Genetics*, 112: 441-57.
- Sherratt, D. J. 2003. 'Bacterial chromosome dynamics', *Science*, 301: 780-5.
- Shi, X., T. Wu, M. Cole C, K. Devaraj N, and S. Joseph. 2018. 'Optimization of ClpXP activity and protein synthesis in an *E. coli* extract-based cell-free expression system', *Sci Rep*, 8: 3488.
- Simmons, Lyle A., James J. Foti, Susan E. Cohen, Graham C. Walker, and James M. Slauch. 2008. 'The SOS Regulatory Network', *EcoSal Plus*, 3.
- Sinden, R. R., and R. S. Cole. 1978. 'Repair of cross-linked DNA and survival of *Escherichia coli* treated with psoralen and light: effects of mutations influencing genetic recombination and DNA metabolism', *J Bacteriol*, 136: 538-47.

- Sinha, A. K., C. Possoz, and D. R. F. Leach. 2020. 'The Roles of Bacterial DNA Double-Strand Break Repair Proteins in Chromosomal DNA Replication', *FEMS Microbiol Rev*, 44: 351-68.
- Sinha, R. P., and D. P. Hader. 2002. 'UV-induced DNA damage and repair: a review', *Photochem Photobiol Sci*, 1: 225-36.
- Skarstad. 1986. 'Timing of initiation of chromosome replication in individual *Escherichiacolicels*'.
Escherichiacolicels.
- Skarstad, K., and T. Katayama. 2013. 'Regulating DNA replication in bacteria', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5: a012922.
- Smeaton, M. B., E. M. Hlavin, A. M. Noronha, S. P. Murphy, C. J. Wilds, and P. S. Miller. 2009. 'Effect of cross-link structure on DNA interstrand cross-link repair synthesis', *Chem Res Toxicol*, 22: 1285-97.
- Smith, G. R. 2012. 'How RecBCD enzyme and Chi promote DNA break repair and recombination: a molecular biologist's view', *Microbiol Mol Biol Rev*, 76: 217-28.
- Smith, K. E., P. R. Wilker, P. L. Reiter, E. B. Hedican, J. B. Bender, and C. W. Hedberg. 2012. 'Antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157 infection and the risk of hemolytic uremic syndrome, Minnesota', *Pediatr Infect Dis J*, 31: 37-41.
- Smith-Kielland, Ingrid. 1966. 'The effect of mitomycin C on ribonucleic acid synthesis in growing cultures of *Escherichia coli*', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 119: 486-91.
- Sommer, F., and F. Backhed. 2013. 'The gut microbiota--masters of host development and physiology', *Nat Rev Microbiol*, 11: 227-38.
- Story, R. M., and T. A. Steitz. 1992. 'Structure of the recA protein-ADP complex', *Nature*, 355: 374-6.
- Stouf, M., J. C. Meile, and F. Cornet. 2013. 'FtsK actively segregates sister chromosomes in *Escherichia coli*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 11157-62.
- Sun, Z. Z., C. A. Hayes, J. Shin, F. Caschera, R. M. Murray, and V. Noireaux. 2013. 'Protocols for implementing an *Escherichia coli* based TX-TL cell-free expression system for synthetic biology', *J Vis Exp*: e50762.
- Sunako, Y., T. Onogi, and S. Hiraga. 2001. 'Sister chromosome cohesion of *Escherichia coli*', *Mol Microbiol*, 42: 1233-41.
- Suzuki, H., K. Nagai, H. Yamaki, N. Tanaka, and H. Umezawa. 1968. 'Mechanism of action of bleomycin. Studies with the growing culture of bacterial and tumor cells', *J Antibiot (Tokyo)*, 21: 379-86.

- Svobodova, A., D. Walterova, and J. Vostalova. 2006. 'Ultraviolet light induced alteration to the skin', *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 150: 25-38.
- Symington, L. S. 2014. 'End resection at double-strand breaks: mechanism and regulation', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6.
- Szybalski, W., and V. N. Iyer. 1964. 'Crosslinking of DNA by Enzymatically or Chemically Activated Mitomycins and Porfiromycins, Bifunctionally "Alkylating" Antibiotics', *Fed Proc*, 23: 946-57.
- T.Reardon, AzizSancarJoyce. 2004. 'Nucleotide Excision Repair in *E. coli* and Man', *Advances in Protein Chemistry*, 69: 43-71.
- Tao Xu, William Brown, Martin G. Marinus. 2012. 'Bleomycin Sensitivity in *Escherichia coli* is Medium- Dependent', *Plos One*.
- Taylor, Andrew F., and Gerald R. Smith. 1985. 'Substrate specificity of the DNA unwinding activity of the RecBC enzyme of *Escherichia coli*', *Journal of Molecular Biology*, 185: 431-43.
- Terato, H., A. Masaoka, K. Asagoshi, A. Honsho, Y. Ohyama, T. Suzuki, M. Yamada, K. Makino, K. Yamamoto, and H. Ide. 2002. 'Novel repair activities of AlkA (3-methyladenine DNA glycosylase II) and endonuclease VIII for xanthine and oxanine, guanine lesions induced by nitric oxide and nitrous acid', *Nucleic Acids Res*, 30: 4975-84.
- Thadani, R., J. Kamenz, S. Heeger, S. Munoz, and F. Uhlmann. 2018. 'Cell-Cycle Regulation of Dynamic Chromosome Association of the Condensin Complex', *Cell Rep*, 23: 2308-17.
- Thadani, R., F. Uhlmann, and S. Heeger. 2012. 'Condensin, chromatin crossbarring and chromosome condensation', *Curr Biol*, 22: R1012-21.
- Thiel, A., M. Valens, I. Vallet-Gely, O. Espeli, and F. Boccard. 2012. 'Long-range chromosome organization in *E. coli*: a site-specific system isolates the Ter macrodomain', *PLoS Genet*, 8: e1002672.
- Tomas, J., J. Reygner, C. Mayeur, R. Ducroc, S. Bouet, C. Bridonneau, J. B. Cavin, M. Thomas, P. Langella, and C. Cherbuy. 2015. 'Early colonizing *Escherichia coli* elicits remodeling of rat colonic epithelium shifting toward a new homeostatic state', *ISME J*, 9: 46-58.
- Tomasz, M., J. K. Barton, C. C. Magliozzo, D. Tucker, E. M. Lafer, and B. D. Stollar. 1983. 'Lack of Z-DNA conformation in mitomycin-modified polynucleotides having inverted circular dichroism', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80: 2874-8.
- Torii, H., K. Ohnuma, T. Kurihara, K. Tsubota, and K. Negishi. 2017. 'Violet Light Transmission is Related to Myopia Progression in Adult High Myopia', *Sci Rep*, 7: 14523.
- Touchon, M., C. Hoede, O. Tenaillon, V. Barbe, S. Baeriswyl, P. Bidet, E. Bingen, S. Bonacorsi, C. Bouchier, O. Bouvet, A. Calteau, H. Chiapello, O. Clermont, S. Cruveiller, A. Danchin, M. Diard, C. Dossat, M. E. Karoui, E. Frapy, L. Garry, J. M. Ghigo, A. M. Gilles, J. Johnson, C. Le Bouguenec, M. Lescat, S. Mangenot, V. Martinez-Jehanne, I. Matic, X. Nassif, S.

- Oztas, M. A. Petit, C. Pichon, Z. Rouy, C. S. Ruf, D. Schneider, J. Tourret, B. Vacherie, D. Vallenet, C. Medigue, E. P. Rocha, and E. Denamur. 2009. 'Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths', *PLoS Genet*, 5: e1000344.
- Trusca, D., S. Scott, C. Thompson, and D. Bramhill. 1998. 'Bacterial SOS checkpoint protein SulA inhibits polymerization of purified FtsZ cell division protein', *J Bacteriol*, 180: 3946-53.
- Ubeda, C., P. Barry, J. R. Penades, and R. P. Novick. 2007. 'A pathogenicity island replicon in *Staphylococcus aureus* replicates as an unstable plasmid', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 14182-8.
- Umezawa, H., M. Ishizuka, K. Maeda, and T. Takeuchi. 1967. 'Studies on bleomycin', *Cancer*, 20: 891-5.
- Umezawa, H., K. Maeda, T. Takeuchi, and Y. Okami. 1966. 'New antibiotics, bleomycin A and B', *J Antibiot (Tokyo)*, 19: 200-9.
- Uranga, L. A., E. D. Reyes, P. L. Patidar, L. N. Redman, and S. L. Luseti. 2017. 'The cohesin-like RecN protein stimulates RecA-mediated recombinational repair of DNA double-strand breaks', *Nat Commun*, 8: 15282.
- Valens, M., S. Penaud, M. Rossignol, F. Cornet, and F. Boccard. 2004. 'Macrodomain organization of the *Escherichia coli* chromosome', *EMBO J*, 23: 4330-41.
- van der Veen, S., and C. M. Tang. 2015. 'The BER necessities: the repair of DNA damage in human-adapted bacterial pathogens', *Nat Rev Microbiol*, 13: 83-94.
- Van Duyne, G. D. 2015. 'Cre Recombinase', *Microbiol Spectr*, 3: MDNA3-0014-2014.
- van Elsas, J. D., A. V. Semenov, R. Costa, and J. T. Trevors. 2011. 'Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects', *ISME J*, 5: 173-83.
- van Oijen, A. M., and J. J. Loparo. 2010. 'Single-molecule studies of the replisome', *Annu Rev Biophys*, 39: 429-48.
- van Opijnen, T., K. L. Bodi, and A. Camilli. 2009. 'Tn-seq: high-throughput parallel sequencing for fitness and genetic interaction studies in microorganisms', *Nat Methods*, 6: 767-72.
- Vera, A., A. Aris, M. Carrio, N. Gonzalez-Montalban, and A. Villaverde. 2005. 'Lon and ClpP proteases participate in the physiological disintegration of bacterial inclusion bodies', *J Biotechnol*, 119: 163-71.
- Verweij, J., and H. M. Pinedo. 1990. 'Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations', *Anticancer Drugs*, 1: 5-13.

- Vickridge, E., C. Planchenault, C. Cockram, I. G. Junceda, and O. Espeli. 2017. 'Management of *E. coli* sister chromatid cohesion in response to genotoxic stress', *Nat Commun*, 8: 14618.
- Vig, B. K., and R. Lewis. 1978. 'Genetic toxicology of bleomycin', *Mutat Res*, 55: 121-45.
- Villaverde, Antonio, and Jordi Barbé. 1992. 'SOS system induction in *Escherichia coli* cells with distinct levels of ribonucleotide reductase activity', *Mutation Research Letters*, 281: 137-41.
- Walk, S. T., E. W. Alm, D. M. Gordon, J. L. Ram, G. A. Toranzos, J. M. Tiedje, and T. S. Whittam. 2009. 'Cryptic lineages of the genus *Escherichia*', *Appl Environ Microbiol*, 75: 6534-44.
- Wallden, M., D. Fange, E. G. Lundius, O. Baltekin, and J. Elf. 2016. 'The Synchronization of Replication and Division Cycles in Individual *E. coli* Cells', *Cell*, 166: 729-39.
- Wang, X., R. Reyes-Lamothe, and D. J. Sherratt. 2008. 'Modulation of *Escherichia coli* sister chromosome cohesion by topoisomerase IV', *Genes Dev*, 22: 2426-33.
- Warr, A. R., A. N. Klimova, A. N. Nwaobasi, and S. J. Sandler. 2019. 'Protease-deficient SOS constitutive cells have RecN-dependent cell division phenotypes', *Mol Microbiol*, 111: 405-22.
- Warren, G. M., R. A. Stein, H. S. McHaourab, and B. F. Eichman. 2018. 'Movement of the RecG Motor Domain upon DNA Binding Is Required for Efficient Fork Reversal', *Int J Mol Sci*, 19.
- Watson, J. D., and F. H. Crick. 1953. 'Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid', *Nature*, 171: 737-8.
- Weart, R. B., S. Nakano, B. E. Lane, P. Zuber, and P. A. Levin. 2005. 'The ClpX chaperone modulates assembly of the tubulin-like protein FtsZ', *Mol Microbiol*, 57: 238-49.
- Webb, John S. 1962. 'THE STRUCTURES OF MITOMYCINS PORFIROMYCIN—PART I'.
- Weichart, D., N. Querfurth, M. Dreger, and R. Hengge-Aronis. 2003. 'Global role for ClpP-containing proteases in stationary-phase adaptation of *Escherichia coli*', *J Bacteriol*, 185: 115-25.
- Welch, R. A., V. Burland, G. Plunkett, 3rd, P. Redford, P. Roesch, D. Rasko, E. L. Buckles, S. R. Liou, A. Boutin, J. Hackett, D. Stroud, G. F. Mayhew, D. J. Rose, S. Zhou, D. C. Schwartz, N. T. Perna, H. L. Mobley, M. S. Donnenberg, and F. R. Blattner. 2002. 'Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 17020-4.
- Wendel, B. M., J. M. Cole, C. T. Courcelle, and J. Courcelle. 2018. 'SbcC-SbcD and ExoI process convergent forks to complete chromosome replication', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: 349-54.

- Whitby, M. C., and R. G. Lloyd. 1995. 'Branch migration of three-strand recombination intermediates by RecG, a possible pathway for securing exchanges initiated by 3'-tailed duplex DNA', *EMBO J*, 14: 3302-10.
- Wiktor, J., A. H. Gynna, P. Leroy, J. Larsson, G. Coceano, I. Testa, and J. Elf. 2021. 'RecA finds homologous DNA by reduced dimensionality search', *Nature*, 597: 426-29.
- Wolanski, M., R. Donczew, A. Zawilak-Pawlik, and J. Zakrzewska-Czerwinska. 2014. 'oriC-encoded instructions for the initiation of bacterial chromosome replication', *Front Microbiol*, 5: 735.
- Worcel, A., and E. Burgi. 1972. 'On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*', *Journal of Molecular Biology*, 71: 127-47.
- Wu, A. 1982. 'Formation of nascent heteroduplex structures by RecA protein and DNA', *Cell*, 30: 37-44.
- Wurihan, Gezi, E. Brambilla, S. Wang, H. Sun, L. Fan, Y. Shi, B. Sclavi, and Morigen. 2018. 'DnaA and LexA Proteins Regulate Transcription of the *uvrB* Gene in *Escherichia coli*: The Role of DnaA in the Control of the SOS Regulon', *Front Microbiol*, 9: 1212.
- Yadav, V., and P. Talwar. 2019. 'Repositioning of fluoroquinolones from antibiotic to anti-cancer agents: An underestimated truth', *Biomed Pharmacother*, 111: 934-46.
- Yamaguchi, H., K. Hanada, Y. Asami, J. I. Kato, and H. Ikeda. 2000. 'Control of genetic stability in *Escherichia coli*: the *SbcB* 3'-5' exonuclease suppresses illegitimate recombination promoted by the *RecE* 5'-3' exonuclease', *Genes Cells*, 5: 101-9.
- Yamaichi, Y., and T. Dorr. 2017. 'Transposon Insertion Site Sequencing for Synthetic Lethal Screening', *Methods Mol Biol*, 1624: 39-49.
- Yamamoto, Y., M. Katsuki, M. Sekiguchi, and N. Otsuji. 1978. '*Escherichia coli* gene that controls sensitivity to alkylating agents', *J Bacteriol*, 135: 144-52.
- Yu, D., H. M. Ellis, E. C. Lee, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, and D. L. Court. 2000. 'An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 5978-83.
- Zhang, A. P., Y. Z. Pigli, and P. A. Rice. 2010. 'Structure of the LexA-DNA complex and implications for SOS box measurement', *Nature*, 466: 883-6.
- Zou, Y., C. Luo, and N. E. Geacintov. 2001. 'Hierarchy of DNA damage recognition in *Escherichia coli* nucleotide excision repair', *Biochemistry*, 40: 2923-31.

XI. Annexes

Annexe 1 Tableau des souches

N°	Souches	Génotype	Résistance	Référence
1	MG1655	<i>E. coli</i> K12		Espeli
2	MG1656	<i>E. coli</i> K12 Δ lacMlul		Espeli
9	MG1655	DnaC ^{TS}	Tet	Espeli
150	MG1655	SP1pXiAKpsulaGFP	FBG140	Espeli
290	MG1655	Δ recN::Cam Humcherry:: Kan	Cam Kan	Espeli
420	MG1655	RecA-Mcherry aidBT1	Cam	Espeli
428	MG1655	aidB laclox +pZA31	Cam	Espeli
427	MG1655	aidBT1 HU-mcherry	Amp Kan	Espeli
436	MG1655	aidBT1 HU-mcherry	Kan	Espeli
453	DY330	W3110 Δ lacU169 gal490 λ ci857 Δ (cro-bioA)		Espeli
480	MG1655	aidbLacLox		Espeli
486	MG1655	Δ recN		Espeli
501	MG1655	aidBT1 HU-mcherry Δ recN	Cam Amp Kan	Espeli
543	MG1655	aidbLacLox		Espeli
648	MG1656	aidb LacLoxP	Rif	Espeli
652	MG1655	iscel::ytfJ iscel leuO::tn10	Kan	Stephane Duigou
658	MG1656	MG1656 ori3 laclox lexA ind-	Tet	Espeli
683	MG1655	yftJ::iscel araB::iscel leuO::tn10 aidBT1+pFH		Espeli
767	MG1655	yftJ::iscel araB::iscel leuO::tn10 DnaCts::tec	Tet	Espeli
778	MG1655	Δ sfia Δ lexA51		Espeli
800	MG1655	yftJ::iscel araB::iscel leuO::tn10aidBT1 Δ recN		
808	MG1655	Δ clpX		Espeli
810	MG1655	Δ clpXP::Cam	Cam	Espeli
854	MG1655	aidB laclox lexA ind-	Tet	Espeli
1184	MG1655	MG1655 RP4-2-Tet::[Δ Mu1::aac(3)IV- Δ aphA- Δ nic35- Δ Mu2::zeo] Δ dapA::(erm-pir) Δ recA	Cam Kan Amp	Stephane Duigou
1629	MG1655	Δ uvrA::Cam (JJC 2044)	Cam	ce travail
1630	MG1655	Δ uvrB::Cam (JJC 2045)	Cam	ce travail
1631	MG1655	Δ uvrC::Tet (CAG 12156)	Tet	ce travail
1632	MG1655	Δ radA::Kan (JJC 2162)	Kan	ce travail
1633	MG1655	Δ recN Δ uvrA::Cam (JJC 2044)	Cam	ce travail
1634	MG1655	Δ recN Δ uvrB::Cam (JJC 2045)	Cam	ce travail
1635	MG1655	Δ recN Δ uvrC::Tet (CAG 12156)	Tet	ce travail
1636	MG1655	Δ recN Δ radA::Kan (JJC2162)	Kan	ce travail
1637	MG1655	aidB lacloxP Δ uvrA::Cam (JJC 2044)	Cam Kan	ce travail
1638	MG1655	aidB lacloxP Δ uvrB::Cam (JJC 2045)	Cam	ce travail
1639	MG1655	aidB lacloxP Δ uvrC::Tet (CAG 12156)	Tet	ce travail
1640	MG1655	aidB lacloxP Δ radA::Kan (JJC 2162)	Kan	ce travail
1641	MG1655	aidB lacloxP Δ recN Δ uvrA::Cam (JJC 2044)	Cam	ce travail
1642	MG1655	aidB lacloxP Δ recN Δ uvrB::Cam (JJC 2045)	Cam	ce travail
1643	MG1655	aidB lacloxP Δ recN Δ uvrC::Tet (CAG 12156)	Tet	ce travail
1644	MG1655	aidB lacloxP Δ recN Δ radA::Kan (JJC 2162)	Kan	ce travail
1775	MG1655	aidB lacloxP Δ uvrA::Cam(JJC 2044)	Cam	ce travail

1776	MG1655	LexA ind- Tet $\Delta recN::Cam$	Tet Cam	ce travail
1777	MG1655	ParE ^{TS} $\Delta radA :: Kan$ (JJC2162)	Tet Kan	ce travail
1778	MG1655	ParE ^{TS} $\Delta recN :: Cam \Delta radA::Kan$ (JJC2162)	Tet Kan Cam	ce travail
1779	MG1655	RecN 3XF-E1	Cam	ce travail
1780	MG1655	DnaC ^{TS} RecN 3XF-E1	Cam Tet	ce travail
1781	MG1655	RecN-3XF-H5	Cam	ce travail
1783	MG1655	Système Cre	Amp	ce travail
1811	MG1655	RecN-3X Flag E1 (FRT)		ce travail
1813	MG1655	$\Delta uvrA::Cam radA::Kan$	Cam Kan	ce travail
1815	MG1655	$\Delta recN \Delta radA::Kan$	Kan	ce travail
1817	MG1655	$\Delta recN \Delta uvrA :: Cam \Delta radA::Kan$	Cam Kan	ce travail
1818	MG1655	$\Delta recN \Delta uvrA :: Cam) radA(kan)$	Cam Kan	ce travail
1819	MG1655	aidB Lac Lox ori3 $\Delta uvrA::Cam \Delta radA :: Kan$	Cam Kan	ce travail
1821	MG1655	aidB Lac Lox ori3 $\Delta recN uvrA :: Cam radA :: Kan$	Cam Kan	ce travail
1840	MG1655	DLT 359F-uB SopB miV Hu-XFP Thymidine-	Cam Tet	ce travail
1841	MG1655	DLT 3734 FAS-PA SUPB-miv Hu-XPF Thymidine-	Cam Tet Kan	ce travail
1842	MG1655	DnaC ^{TS} RecN EXF-E1	Cam Tet	ce travail
1843	MG1655	RecN-3XF-E1-NM		ce travail
1969	MG1655	(F- lambda- ilvG- rfb-50 rph-1, DnaC ^{TS} ::Tc), RecN-3XF-E1-NM (transduction DnaC ^{TS} , lysat à partir souche DnaC ^{TS} (N°9)	Tet	ce travail
1972	MG1655	(F- lambda- ilvG- rfb-50 rph-1 , DnaC ^{TS} ::Tc), RecN-3XF-E1-NM (transduction DnaC ^{TS} , lysat à partir DnaC ^{TS} (N°9)	Tet Cam	ce travail
1973	MG1655	(F- lambda- ilvG- rfb-50 rph-1, DnaC ^{TS} ::Tc), RecN-3XF-E1-NM (transduction DnaC ^{TS} , lysat à partir souche DnaC ^{TS} (N°9) elle-même créée à partir du lysat J-L Ferrat) $uvrB::Cam$ (JJC 2045)	Tet Cam	ce travail
1974	MG1655	(F- lambda- ilvG- rfb-50 rph-1, DnaC ^{TS} ::Tc), RecN-3XF-E1-NM (transduction DnaC ^{TS} , lysat à partir souche Dn DnaC ^{TS} aCts(N°9) elle-même créée à partir du lysat J-L Ferrat) $radA::Kan$ (JJC 2162)	Tet Kan	ce travail
2058	MG1655	ori3 lacloxP $\Delta sfiA/sulA :: Kan$	Kan Cam	ce travail
2060	MG1655	$\Delta lexA51::Cam$ (de n°778)	Cam	ce travail
2160	MG1655	$\Delta sfiA \Delta lexA51 uvrC::Tet$ (CAG 12156))	Tet	ce travail
2163	MG1655	$\Delta sfiA \Delta lexA51 uvrC::Tet$ (CAG 12156))	Kan Tet	ce travail
2166	MG1655	$\Delta sfiA \Delta lexA51 uvrB::Cam$ (JJC 2045))	Cam	ce travail
2169	MG1655	$\Delta sfiA \Delta lexA51 uvrA::Cam$ (JJC 2044))	Cam	ce travail
2171	MG1655	$\Delta sfiA \Delta lexA51 radA2::Kan$ (JJC 2162))	Kan	ce travail
2173	MG1655	$yftJ::lscel araB::lscel leuO::tn10$	Kan Cam	ce travail
2175	MG1655	$yftJ::lscel araB::lscel leuO::tn10$ (lysat 1629 ($uvrA::Cam$ (JJC 2044)	Kan Cam	ce travail
2176	MG1655	$yftJ::lscel araB::lscel leuO::tn10$ (lysat de 1630 ($uvrB::Cam$ (JJC 2045))	Kan Cam	ce travail
2177	MG1655	$yftJ::lscel araB::lscel leuO::tn10$ (lysat de 1631 ($uvrC::Tet$ (CAG 12156))	Kan Tet	ce travail
2178	MG1655	$yftJ::lscel araB::lscel leuO::tn10$ (lysat de 1631 ($uvrC::Tet$ (CAG 12156))	Kan Tet	ce travail
2220	MG1655	$\Delta phr::Cam$	Cam	ce travail
2224	MG1655	$\Delta rmuC ::Cam$	Cam	ce travail
2226	MG1655	$\Delta recX::Cam$	Cam	ce travail
2228	MG1655	$\Delta recN \Delta phr::Cam$	Cam	ce travail

Annexes

2230	MG1655	<i>ΔrecN ΔradA::Cam</i>	Cam	ce travail
2232	MG1655	<i>ΔrecN ΔrmuC::Cam</i>	Cam	ce travail
2234	MG1655	<i>ΔrecN ΔrecX::Cam</i>	Cam	ce travail
2236	MG1655	<i>ΔuvrC Δphr</i>	Cam	ce travail
2238	MG1655	<i>ΔuvrC ΔradA</i>	Cam	ce travail
2240	MG1655	<i>ΔuvrC ΔrmuC</i>	Cam	ce travail
2243	MG1655	<i>ΔuvrC ΔrecX</i>	Cam	ce travail
2246	MG1655	<i>ΔradA Δphr</i>	Cam	ce travail
2247	MG1655	<i>ΔradA ΔrmuC</i>	Cam	ce travail
2250	MG1655	<i>ΔradA ΔrecX</i>	Cam	ce travail
2251	MG1655	<i>RecN-Y Δphr</i>	Cam	ce travail
2253	MG1655	<i>RecN-Y ΔradA</i>	Cam	ce travail
2255	MG1655	<i>RecN-Y ΔrecX</i>	Cam	ce travail
2257	MG1655	<i>RecN-Y (ΔrmuC)</i>	Cam	ce travail
2259	DH5Alpha	pKO3 + LacZ 30°C (exprime LacZ)	Cam	ce travail
2318	MG1655	<i>ΔclpXP</i>	Cam	ce travail
2358	MG1655	<i>lacZ::(Cre système (frt)) Ara 1% inductible</i>	Cam	Yoshi
2360	MG1655	<i>ΔrecN LacZ:: Cre Ara 1% inductible</i>	Cam	ce travail
2361	MG1655	<i>RecN-3XF lacZ:: Cre (frt) :: Cam :: frt Ara 1% inductible</i>	Cam	ce travail
2362	MG1655	<i>ΔuvrA::Cam LacZ::Cre</i>	Cam	ce travail
2396	MG1655	<i>ΔrecN</i>	Tet	ce travail
2397	MG1655	<i>ΔclpX ΔuvrA</i>	Cam Kan	ce travail
2398	MG1655	<i>ΔclpX ΔuvrA + RecN-3XF</i>	Cam Kan	ce travail
2352	MG1655	<i>DnaC^{TS} MukB Spa1</i>	Cam Tet	Espeli
2353	MG1655	<i>DnaC^{TS} APL Spa</i>	Tet	Espeli
2354	MG1655	<i>DnaC^{TS} MG1656 Z1 MukB APL</i>	Tet	Espeli
2355	MG1655	<i>MukB Spa</i>	Tet	Espeli
2356	DH5Alpha	<i>Lambda Pir Cre</i>	Cam	Espeli
2357	MG1655	<i>LacZ:: Cre système frt :: CamR :: frt Ara 1% inductible</i>	Cam	Yoshi
KEIO	MG1655	<i>ΔsurA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔnuoA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔdedD</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔhypA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔborD</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔdinI</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔfruK</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔnuoK</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔamiA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔrecF</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔhslU</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔhslV</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔpriA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔacrA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)

KEIO	MG1655	<i>ΔyceH</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔdadX</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔydhW</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔyniA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔyjdM</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔfliQ</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔyeeD</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>Δwzb</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔyejH</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔnuoI</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔyfcJ</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔpyrE</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>Δrep</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔpfkA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔhflK</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔhflC</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔpurA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔyceK</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔpaaK</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔybfE</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔsurA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔnuoA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔdedD</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔhypA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔborD</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔdinI</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔfruK</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔnuoK</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔamiA</i>	Kan	(Baba et al. 2006)
KEIO	MG1655	<i>ΔrecF</i>	Kan	(Baba et al. 2006)

Annexe 2 Tableau des plasmides

Plasmides	Notes	Résistances	Références
pSc-189 DMF-Mariner	Plasmide conjugatif transportant le transposon Mariner	Kan	(Chiang (Chiang and Rubin 2002) and Rubin 2002)
pGBKD 3-2	<i>LacLoxP</i>	Cam	(Lesterlin et al. 2012)
pCre	Système recombinaison Cre	Spec	(Lesterlin et al. 2012)
pKD4		Kan	(Abremski and Hoess 1985)
pKO3		Cam (Thermosensibles 42°C)	(A J LinK 1997)
pcgcGi		Amp	Espeli
pRecN_GFP		Spec	Espeli
p3xFLAG [®] -CMV [™] -(OGS628)		Amp	https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sigma/ogs628
pZA		Cam	Espeli
pZA RecN		Cam	Espeli
pZA31	(<i>PsulA-GFP Δxho1</i>)	Cam	Espeli
pFH2973	Plasmide d'expression de ParB	Amp	(Nielsen et al. 2006; Duigou and Boccard 2017)
pHK-int	Plasmide intégratif	Amp	(Rossignol, Moulin, and Boccard 2002)
pLDR11		Amp Tet	(Diederich, Rasmussen, and Messer 1992; Rossignol, Moulin, and Boccard 2002)
pCP20		Amp Cam	(Cherepanov and Wackernagel 1995)

Annexe 3 Tableau des amorces

Code	Séquences 5'-3'
ABC 1	GCTTTACTAAGCTTATGCATAATGTGC
ABC 2	CGGAATTCGAGCTCTTACGTTGACACC
ABC 3	GATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGG
ABC 4	CGAGATAACCGTTGGCCTCAATCG
ABC 5	GATATCTCACGTACTIONGACGGTGG
ABC 6	GAACGATGCCCTCATTGAGCATTGTC
ABC 7	CATGCCAGCGCAACAGGTTATCAGC
ABC 8	CTTCGGGTCAGGGTTAAATTCACG
ABC 9	CCAATGCTTAATCAGTGAGGCACC
ABC 10	GGTTCATCATGCCGTTTGTGATG
ABC 11	CCATTGGGATATATCAACGGTGG
ABC 12	GGCTTCCATGTCGGCAGATGC
ABC 13	GCCATTGGGATATATCAACGGTGG
ABC 14	ACGACCAGTCAATCTACGGC
ABC 15	TTTTTACCCAGACGCCCGTT
ABC 16	TGGTGGGATTGTTGCGGTA
ABC 17	ATCTCTCCAGAAGCGCCTG
ABC 18	GATACAGTCGCGCCTGGAAA
ABC 19	GGTGGCAAACACTIONGCTG
ABC 20	GCTACCACGCTTTTCAGCTC
ABC 21	CTGTCTCCAGCTTCTCCCG
ABC 22	ACTCCCTGTCCAACATGCAG
ABC 23	CGTGAACCATCTGTCGGGAA
ABC 24	CGAACAGCTGCTTAACGCTC
ABC 25	ATTCGCTCCGTCACCGAAT
ABC 26	GGCCGCTCAATAAAGTTGGC
ABC 27	CCGGTTTTGCCAAATACCG
ABC 28	TTAAGCGCCGATTTGTGAC
ABC 29	GATCGGTAACACAATGCCGC
ABC 30	CGCACGTTGAAATCAAAGCG
ABC 31	TCCATTTTGCTGCCTTTCGC

Annexes

ABC 32	TCGGTGGTATGCTGGAGTTC
ABC 33	TGCAGCAGCTATCGTCAGAC
ABC 34	ATGGGCATTCTCGGTTGTT
ABC 35	TGGCAGCAACCACAGTCAAT
ABC 36	CCTTAAGCGGCAAAACCAGC
ABC 37	TCGCCGGTCAGATTTCCAG
ABC11_2	TTA CAG CGC ATA GTG ATT TGA TTC C
ABC10_2	GGCACTGATTTTTGATGAAGTGGA
ABC8_2:	TCT ATC ACC AGT TCC TGC AAT TCA G
ABC9_2:	TGT TCA ATA GCG GTG GTA TCA AAA C
ABC3_2	CAC TTT TGT TAC GCG TTT TTG TCA T
ABC4_2	CCGTAAATCAATCGATGAGTTGCTT
ABC5_2	ACC AGA CAC CCA TCA ACA GTA TTA Tc
ABC6_2	AGAAGCAGATAAGCGATAAGTTTGC
ABCX	TGACTGCATATGTTGTGTTTTACAGT
ABCX-2	GGTTACGCTGGATTTCAATATCGTT
ABC UvrA Do - 514	CGAAGAGGCGCGTGAGTTCTTTGATGC
ABC UvrA Up - 514	GCC GGA AGA AAA ACG TAA ATT GCT GG
ABC UvrB Up - 530	CGA CGA GTA AAA TTA CAT ACC TGC CC
ABC UvrB Do - 530	GGA GCA TCA TCT TGA GAT ATA AAT CAG G
ABC UvrC Up - 533	CGT AGG GAT ATT AAA TTG CAT AAT GAC G
ABC UvrC Do - 533	CGG ATG TGA TCC TTA TCG ACG GC
ABC RadA Up-557	GGC AGC CTG AAT CAG AAG TAA TTG CTC G
ABC RadA Do -557	GGC AGA TCT GTT CGA TGC TGG TTT CC
1021 ydeV qPCR up	CGACACCTATACGCTG
1020 ydeQ qPCR do	ACTGACTGGACGGTTC
RecN-3XF Up + linker	ACGTAATACACTGGCGAATGCGAAAGAACTGCTTGCAGCG CTG GGT GGC GGT GGC TCT CGC GCG GCG GACTACAAAGACCATGACGGTGATTA
RecN-3XF Do	CGTTTTGCTGTTTACTCTGACCGTGAAGCAGGAAAAAGTAAGCTTTTAAGGTTTAACGGT
PCR1UVRA C_ter SacI	AGCTGAGAGCTCATGGATAAAGATCGAAGTTCGGGGCG
PCR1UVRA C_ter BamHI	GATTAGGATCCTTACAGGTCTTCTTTCAGAGATCAGTTTCTGTTCCGCCGCGGAGAGCCACCGCCACCCAGC AGCATCGGCTTAAGGAAGCGTGCCG
PCR1UVRA N_ter SacI	AAGTGTGAGCTCATGGAACAGAACTGATCTCTGAAGAAGACCTGCTGGGTGGCGGTGGCTCTCGCGCGGC GGATAAGATCGAAGTTCGGGGCGCCCGCAC
PCR1UVRA N_ter BamHI	GATTAGGATCCTTACAGCATCGGCTTAAGGAAGCGTG
DinD_Del_H1	TACAGTTACAGATTTACTTTCTTTGCAATTGATATCACATGGAGTGGGCAAGCTTTTAAGGTTTAACGGT

DinD_Del_H2	TGGCTTACGCATCGGGTGTCTCAATCAACAAAAAGAGTTTTAGTTTCTGGATTGTGTAGGCTGGAGCTGC
DinI_Del_H1	TAGGTTATTTTACCTGTATAAATAACCAGTATATTCAACAGGGGGCTATTAGCTTTTAAGGTTAACGGT
DinI_Del_H2	TAAGTAAATAAAAAGCCGGGGCGACCCGGCAAAAAAATCACTGCATAGATTGTGTAGGCTGGAGCTGC
PhR_Del_H1	TATTCGAACTTTGGCCGCGTGTGATTAACCTGCGCCATTGAGGAGTTTTAGCTTTTAAGGTTAACGGT
PhR_Del_H2	AGGCGTTCACGCCGCATCCGGCATCTGGGCTCGATTGCCTGACGCGTCTGGATTGTGTAGGCTGGAGCTGC
RadA_Del_H1	AATTGCTCGCCGCCATCCTGCGGGCGGCACAGCATTAAACGAGGTACACCAGCTTTTAAGGTTAACGGT
RadA_Del_H2	GGCAGTTTTAGGTAATCAAATGACGACATATCTCCCTCCGTATATCTCAGATTGTGTAGGCTGGAGCTGC
RecX_Del_H1	AAGGGTCGCATCTGCGGCCCTTTTCTTTTTAAGTTGTAAGGATATGCCAGCTTTTAAGGTTAACGGT
RecX_Del_H2	GTGGGAATAAGATAAGTTTTCTTGACTGGGAAGTAAATACCGTATGCGTGATTGTGTAGGCTGGAGCTGC
RmuC_Del_H1	TACAGACAATTCTATTTGTGCGGGTAAGTTGTTGCGTCAGGAGGCGTTAGCTTTTAAGGTTAACGGT
RmuC_Del_H2	TTGGGCGTCGATGCCCTAGATTTCTACCCGGCTTAACACTCCCAATGGGGATTGTGTAGGCTGGAGCTGC
YebG_Del_H1	CCGAAAAGAAATATACTGTATAAAATCACAGTTATTATGAGAGGCTGCAAAGCTTTTAAGGTTAACGGT
YebG_Del_H2	CAATGATTCAGGAGAAAGCATGGTACAAATTGTCAGGAGCGCAAGTTGCTGATTGTGTAGGCTGGAGCTGC
PhR_Verif_Up	GCGTTATTTGAACTTTGGCCGCGTG
PhR_Verif_Do	GTATCAGGCGCTGAAATTCAGAAACCG
RadA_Verif_Up	GAAATCCCGCTGGCGCAGACCGTGGCG
RadA_Verif_Do	GCAGCTCGTCAACCTGGCTACAGGC
RmuC_Verif_Up	GTCGTCTGCTGTAATTCTTCTCC
RmuC_Verif_Do	GGAGAATTTGCTGTCAGGTCGCCG
DinD_Verif_Up	GCAATTGATATCACATGGAGTG
DinD_Verif_Do	ACGCATCGGGTGTCTCAATC
DinI_Verif_Up	CAGTATATTCAACAGGGGGC
DinI_Verif_Do	AAAAGCCGGGGCGACCCGGC
PHR_Verif_Up	GATTAACCTGCGCCATTGAGG
PHR_Verif_Do	GCTCGATTGCCTGACGCGTC
RadA_Verif_Up	CATCCTGCGGGCGGCACAGC
RadA_Verif_Do	TGACGACATATCTCCCTCCG
RecX_Verif_Up	CGCATCTGCGGCCCTTTTGC
RecX_Verif_Do	GAAGTAAATACCGTATGCG
RmuC_Verif_Up	TGTGCGGGTAAGTTGTTGCG
RmuC_Verif_Do	GATGCCCTAGATTTCTACCC
YebG_Verif_Up	TCACAGTTATTATGAGAGGC
YebG_Verif_Do	TTGTCAGGAGCGCAAGTTGC
Cam_Pgb_Up	CATGATGAACCTGAATCGCC
Pgb_V_Lig_Up	CAACGGTGGTATATCCAGTG

Annexes

pgb_V_Lig_Do	TGAAAACAACATAATTTCAGACAT
PCR2_UvrB_Cter_Myc_Up	ATGAGTAAACCGTTCAAACCTGAATTCGCTTTTAAACCTTCTGGCGATCA
PCR2_UvrB_Cter_Myc_Do	GCGCGCTACCTGTGACGGAAGATTAACAGGATAGCGAAGAAGACTGATGACAAACGGAAAACAGCCTGATGCG
V2_PCR2_UvrA_NTer_Up	CGGTAGCACCATGCCACCGGGCAAAAAAGCGTTAATCCGGGAAAGGTGAATGGAACAGAACTGATCTCTGAAGAAGACCTG
V2_PCR2_UvrA_NTer_Do	GCTGGTGCAACTCTGAAAGGAAAAGGCCGCTCAGAAAGCGGCCTAACGAGCGAGGGCTTTACTAAGCTTGATGC
V2_PCR2_UvrA_CTer_Up	GCTGGTGCAACTCTGAAAGGAAAAGGCCGCTCAGAAAGCGGCCTAACGATTAATCTCCGTCACAGGTAGGCGCG
V2_PCR2_UvrA_CTer_Do	ATGGATAAGATCGAAGTTCGGGGCGCCCGCACCCATAATCTCAAAAACATC
Inv_PCR1_UVRA_C_ter_BamHI	AGCTGAGGATCCATGGATAAGATCGAAGTTCGGGGCG
Inv_PCR1_UVRA_C_ter_SacI	GATTAGAGCTCTTACAGGTCTTCTTTCAGAGATCAGTTTCTGTTCCGCCGCGGAGAGCCACCGCCACCCAGCAGCATCGGCTTAAGGAAGCGTGCCG
Inv_PCR1_UVRA_N_ter_BamHI	AAGTGTGGATCCATGGAACAGAACTGATCTCTGAAGAAGACCTGCTGGGTGGCGGTGGCTCTCGCGCGGGATAAAGATCGAAGTTCGGGGCGCCCGCAC
Inv_PCR1_UVRA_N_ter_SacI	GATTAGAGCTCTTACAGCATCGGCTTAAGGAAGCGTGC
Inv_PCR1_UvrB_C_ter_BamHI	AGCTGAGGATCCATGAGTAAACCGTTCAAACCTGAATTCCG
Inv_PCR1_UvrB_C_ter_SacI	GATTAGAGCTCTTACAGGTCTTCTTTCAGAGATCAGTTTCTGTTCCGCCGCGGAGAGCCACCGCCACCCAGCAGATGCCGCGATAAACAGCTCACGCAGC
Inv_PCR1_UvrB_N_ter_BamHI	AAGTGTGGATCCATGGAACAGAACTGATCTCTGAAGAAGACCTGCTGGGTGGCGGTGGCTCTCGCGCGCGAGTAAACCGTTCAAACCTGAATTCCG
Inv_PCR1_UvrB_N_ter_SacI	GATTAG AGCT CTTACGATGCCGCGATAAACAGCTCACGC
Cre Up ATII	ATATGACGTCGCCGTCAATTGTCTGATTGTTACC
Cre Do ATII	ATATGACGTCACATATGGTACCCTAATCGCCATC
LacZ Up BamHI	ATAAGGATCCGTGAGCGGATAACAATTTACACAGG
LacZ Do Sall	ATATGTCGACCGAAATACGGGCAGACATGGCCTGC
LacZ Up VF	GCCGTCTGAATTTGACCTGAGCGC
LacZ Do VF	CATCCACCACATACAGGCCGTAGC
Cre Do VF	GTTATTCAACTTGACCATGCCGC
Cre Up VF	GGACATGTTCCAGGGATCGCCAGGCG
LacZ pKO3 Up	CAGGGCAGGGTCGTTAAATAGCCGC
LacZ pKO3 Do	CGAGGTGCCGTAAGCACTAAATCG
TnSeq_P5spacer_1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGACTTATCAGCCAACCTGT
TnSeq_P5spacer_2	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGACTTATCAGCCAACCTGT
TnSeq_P5spacer_3	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAIGACTTATCAGCCAACCTGT
TnSeq_P5spacer_4	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTGTGACTTATCAGCCAACCTGT
TnSeq_P5spacer_5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTCGACGACTTATCAGCCAACCTGT
TnSeq_P5spacer_6	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCGACGACGACTTATCAGCCAACCTGT

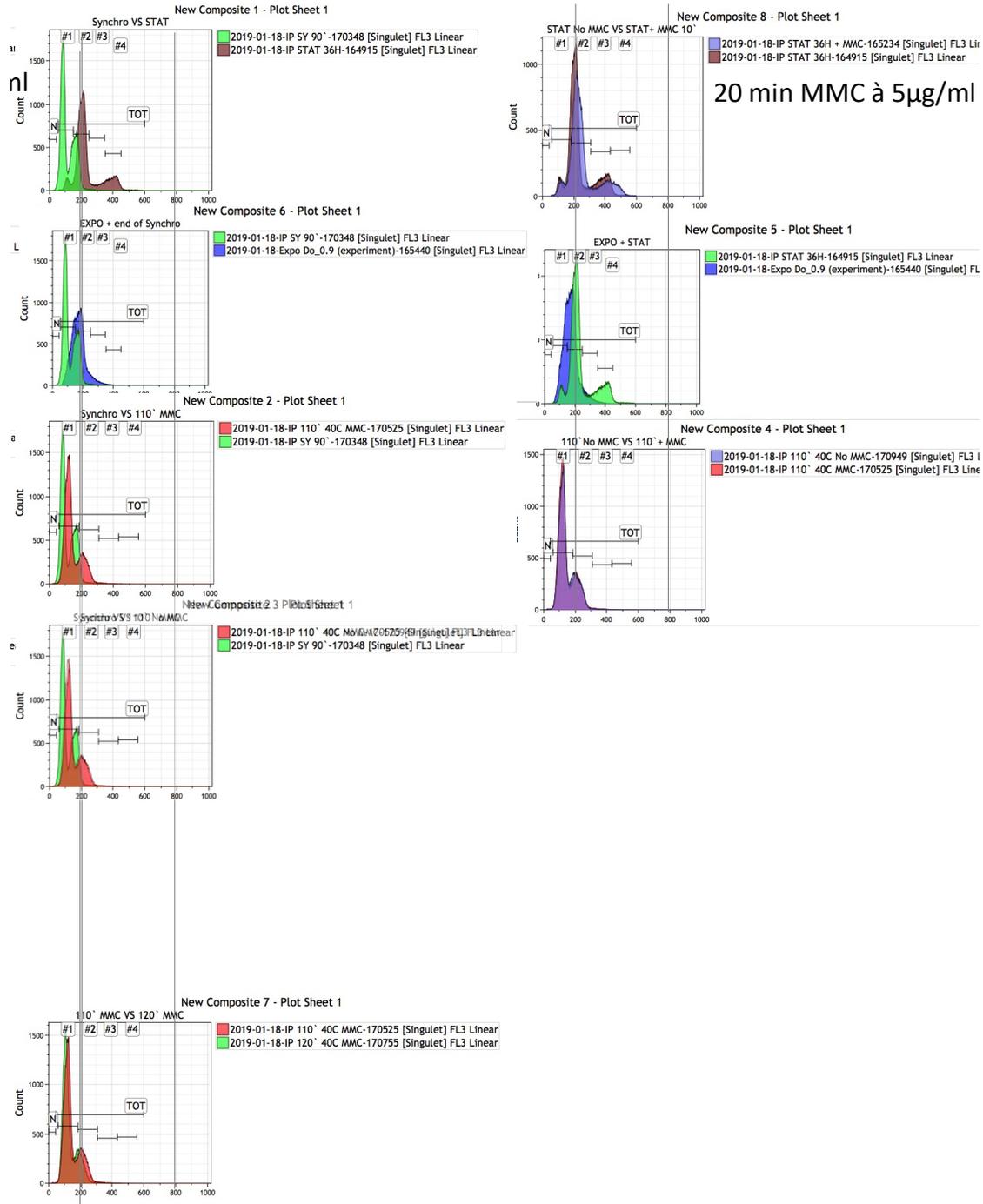
TnSeq_P7_AD_1_AD0 06	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATTGGCGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATC
TnSeq_P7_AD_2_AD0 12	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACAAGGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATC
TnSeq_P7_AD_3_AD0 05	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT <u>CACTGT</u> GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATC
TnSeq_P7_AD_4_AD0 15	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGACATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATC
TnSeq_P7_AD_5_AD0 02	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACATCGGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATC
TnSeq_P7_AD_6_AD0 16	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACATCGGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATC
chain terminato	TACCACGACCA-NH2-3'
index fork adapter	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTGGTCGTGGTAT
Himar3out primer	CGCCTTCTTGACGAGTTC
Index R primer	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTG
YebG_pkd4_H1	CCGAAAAGAAATATACTGTATAAAATCACAGTTATTATGAGAGGCTGCAAGAAGTTCCTATACTTTCTAGAG AATAG
YebG_pkd4_H2	CAATGATTCAGGAGAAAGCATGGTACAAATTGTCAGGAGCGCAAGTTGCTGAAGTTCCTATTCTCTAGAAA GTATAG
YebG_V_H1	GTATAAAATCACAGTTATTATGAG
YebG_V_H2	CAAATTGTCAGGAGCGCAAGTTGC
YbaB_pkd4_H1	CGTAAGCACAGCTTACGTTTCGTCATCCTAACGTGATTGAGAGAGAAACCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAG AATAG
YbaB_pkd4_H2	GACAGCGCAGTGCTTCCATAAGCTGTGTTAACAGCGGGCTGGTTTGCATGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGT ATAG
YbaB_V_H1	GCTTACGTTTCGTCATCCTAACGTG
YbaB_V_H2	CATAAGCTGTGTTAACAGCGGGCTG
XseB_pkd4_H1	CCTGAGTCCGTTACCATGACGGGGCGAAAATATTGAGAGTCAGACATTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAG AATAG
XseB_pkd4_H2	GCCTGGTTGGCCTGCTTAACGCAGGCTTCGAGTTGCTGCGGAAAGTCCATGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAG TATAG
XseB_V_H1	GAGTCCGTTACCATGACGGGGC
XseB_V_H2	CTGGTTGGCCTGCTTAACGCAGGC
UvrD_pkd4_H1	CGGAGGGCGTTGCGCTTCTCCGCCAACCTATTTTTACGCGGGTCCAGAGAAGTTCCTATACTTTCTAGAG AATAG
UvrD_pkd4_H2	CTGAATGATTTTTAGGCCAAATAAGGTGCGCAGCACCGCATCCGGCAACGGAAGTTCCTATTCTCTAGAAA GTATAG
UvrD_V_H1	GCGTTGCGCTTCTCCGCCAAC
UvrD_V_H2	GTGCGCAGCACCGCATCCGGCAACG
RecG_pkd4_H1	CGAAGCTGATGCCGACTGGTGGGCTACTATGCAGGCTGCAGGGTAAGTGCGAAGTTCCTATACTTTCTAGA GAATAG
RecG_pkd4_H2	CGGCAGGAAGGTAGGGTAACCTGAAATGGCGGTCTTCTACTGCCGCTTGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAG TATAG
RecG_V_H1	CGACTGGTGGGCTACTATGCAGGC
RecG_V_H2	CTGAAATGGCGGTCTTCTACTGC
RecF_pkd4_H1	GCGGCCAGCCAGAGCGGGCTTATGTTGTCATGCCAATGAGACTGTAAGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAA TAG
RecF_pkd4_H2	GGAGTCATAAGAATTCGACATCAACGTTTCTCGCTCATTATACTTGGGGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTA TAG

Annexes

RecF_V_H1	GCTTATGTTGTCATGCCAATGAGAC
RecF_V_H2	GAATTCGACATCAACGTTTCTCGC
ExoX_pkd4_H1	GCAAGGCGATATCATTCCATTACGCTAGGCTTTTTTCGGCCTGGAGCATGCCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAG AATAG
ExoX_pkd4_H2	TCTGGTCGCGCTGGCGCAGGGAACATTACCCGCTACGCTGCGGACTAAGGAAGTTCCTATTCTCTAGAAA TATAG
ExoX_V_H1	CATTCCATTACGCTAGGCTTTTTTCG
ExoX_V_H2	GCGCAGGGAACATTACCCGCTACGC
DinI_pkd4_H1	GGTATTTTACCTGTATAAATAACCAGTATATTCAACAGGGGGCTATTGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGA ATAG
DinI_pkd4_H2	CGTAAGTAAAATAAAAAAGCCGGGGCGACCCGGCAAAAAAATCACTGCATAGAAGTTCCTATTCTCTAGA AAGTATAG
DinI_V_H1	CCTGTATAAATAACCAGTATATTC
DinI_V_H2	GTGCAATTATTTGAGGAAGTGTAG
DinD_pkd4_H1	TACAGTTACAGATTTACTTTCTTTGCAATTGATATCACATGGAGTGGGCAGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGA ATAG
DinD_pkd4_H2	GCACCTGGACCTTGGCTTACGCATCGGGTGTCTCAATCAACAAAAGAGTTGAAGTTCCTATTCTCTAGAAA GTATAG
DinD_V_H1	GCAATTGATATCACATGGAGTGGGC
DinD_V_H2	GCACCTGGACCTTGGCTTACGCATC
P2_AN1	CGCCGGTAGCACCATGCCACCGGGCAAAAAAGCGTTTAAATCCGGGAAAGGTGAATGGAACAGAAACTGAT CTCTGAAG
P2_AN2	GTTGATGTTTTGAGATTATGGGTGCGGGCGCCCCGAACTTCGATCTTATCCATGATTGTGTAGGCTGGAGC TGCTTCG
V2_AN1	GCCAGACATTGTTACACAACACTCCG
V2_AN2	CTCCAGTTCACGCATACTGTAGCCGC
P2_AC1	CGTCGCGGAGTGCGAAGCATCACAC
P2_AC2	GCTGGTGCAACTCTGAAAGGAAAAGGCCGCTCAGAAAGCGGCCTAACGAGCGAGGGCTTTACTAAGCTTG CATGC
V2_AC1	CGAAGAGGCGCGTGAGTTCTTTGATGC
P2_BN1	AGTAAACCGTTCAAACCTGAATTCGGCTTTTAAACCTTCTGGCGATCAGCCATGGAACAGAAACTGATCTCTGA AG
P2_BN2	TTACGATGCCGCGATAAACAGCTCACGCAGCTGATGCAACTGGTCACGAAAGCGATTGTGTAGGCTGGAGC TGCTTCG
V2_BN1	CTCATGATTGACAGCGGAGTTTAC
V2_BN2	CGGTGTCGATATCTGAGTGAAGAT
P2_BC1	GCGGCGCAAATTCGTGACCAGTTG
P2_BC2	CGCATCAGGCTGTTTTCCGTTTGTATCAGTCTTCTTCGCTATCCTGTTAAGCGATTGTGTAGGCTGGAGCTG CT
V2_BC1	ATCTTCACTCAGATATCGACACCG
V2_BC2	GTTGAGTTTACCTGCGGCTAATTT
V2_Cat2	AACACTATCCCATATCACCAGCTC
YebG_pkd4_EXT1	CCGAAAAGAAATATACTGTATAAAATCACAGTTATTATGAGAGGCTGCAAGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCA GA
YebG_pkd4_EXT2	CAATGATTACAGAGAAAGCATGGTACAAATTGTCAGGAGCGCAAGTTGCTAGCCATGGTCCATATGAATAT CCTCC

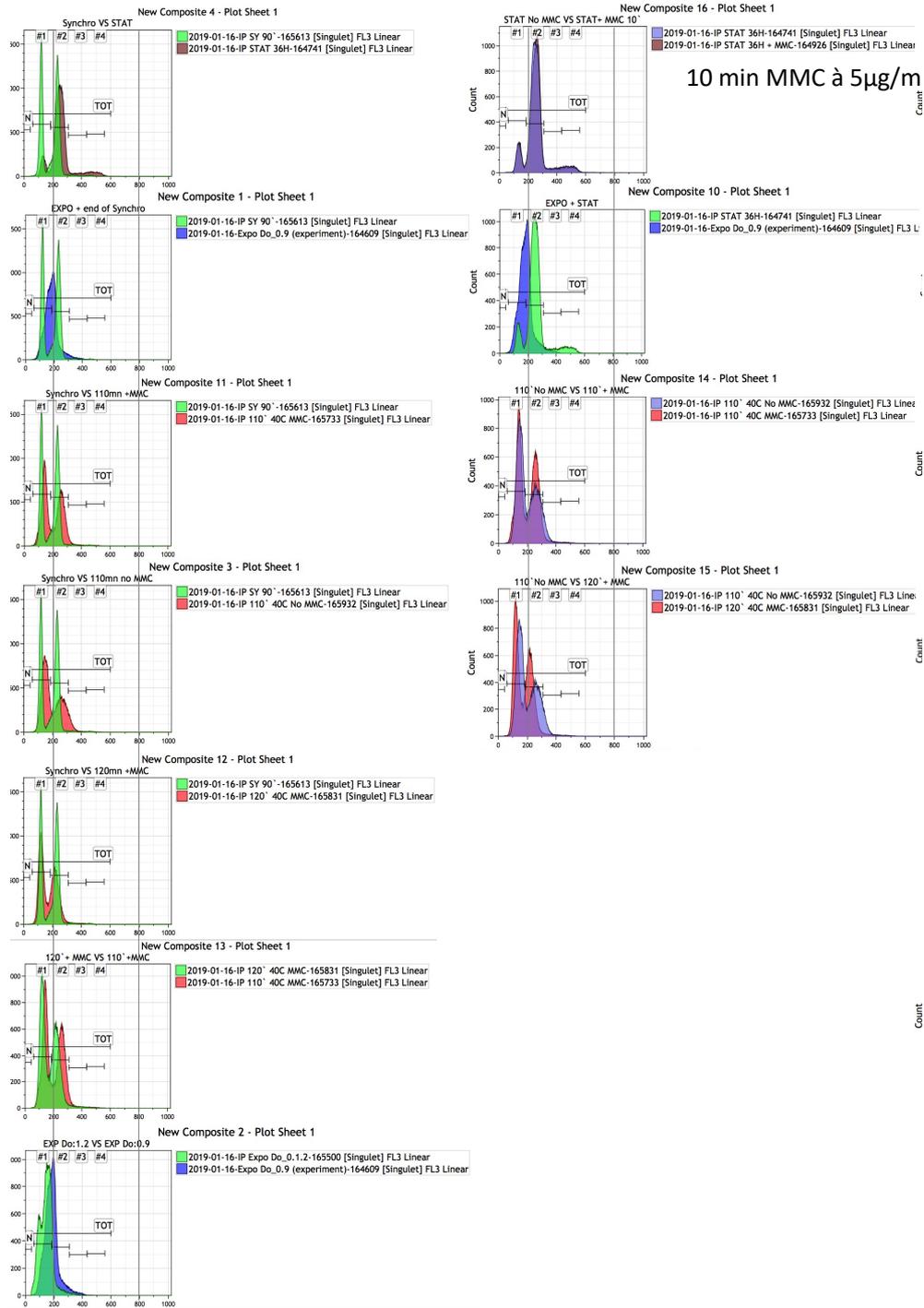
YbaB_pkd4_EXT1	CGTAAGCACAGCTTACGTTTCGTCATCCTTAACGTGATTGAGAGAGAAACCGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCA GA
YbaB_pkd4_EXT2	GACAGCGCAGTGCTTCCATAAGCTGTGTTAACAGCGGGCTGGTTTGCATAGCCATGGTCCATATGAATATCC TCC
190_Xseb_pkd4_ext1	CCTGAGTCCGTTACCATGACGGGGCGAAAAATATTGAGAGTCAGACATTCGCCAGTGCCAAGCTTGCATGC AGA
191_Xseb_pkd4_EXT2	GCCTGGTTGGCCTGCTTAACGCAGGCTTCGAGTTGCTGCGGAAAGTCCATAGCCATGGTCCATATGAATATC CTCC
192_UvrD_pkd4_EXT1	CGGAGGGCGTTGCGCTTCTCCGCCAACCTATTTTTACGCGGCGGTGCCAGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCA GA
193_UvrD_pkd4_EXT2	CTGAATGATTTTTTAGGCCAAATAAGGTGCGCAGCACCGCATCCGGCAACGAGCCATGGTCCATATGAATAT CCTCC
194_RecG_pkd4_EXT 1	CGAAGCTGATGCCGACTGGTGGGCTACTATGCAGGCTGCAGGGTAAGTGCGCCAGTGCCAAGCTTGCATGC AGA
195_RecG_pkd4_EXT 2	CGGCAGGAAGGTAGGGTAACCTGAAATGGCGGTCTTCTACTGCCGCTTAGCCATGGTCCATATGAATATC CTCC
196_RecF_pkd4_EXT1	GCGGCCAGCCAGAGCGCGGCTTATGTTGTCATGCCAATGAGACTGTAAGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCAG A
197_RecF_pkd4_EXT2	GGAGTCATAAGAATTCGACATCAACGTTTTCTCGCTCATTATATACTTGGGAGCCATGGTCCATATGAATATCCT CC
198_ExoX_pkd4_EXT1	GCAAGGCGATATCATTCCATTACGCTAGGCTTTTTCGGCCTGGAGCATGCGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCA GA
199_ExoX_pkd4_EXT2	TCTGGTCGCGCTGGCGCAGGGAACATTACCCGCTACGCTGCGGACTAAGAGCCATGGTCCATATGAATATC CTCC
200_DinI_pkd4_EXT1	GGTTATTTTACCTGTATAAATAACCCAGTATATTCAACAGGGGGCTATTGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCAGA
201_DinI_pkd4_EXT2	CGTAAGTAAAATAAAAAAGCCGGGGCGACCCGGCAAAAAAATCACTGCATAAGCCATGGTCCATATGAAT ATCCTCC
202_DinD_pkd4_EXT1	TACAGTTACAGATTTACTTTCTTTGCAATTGATATCACATGGAGTGGGCAGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCA GA
203_DinD_pkd4_EXT2	GCACCTGGACCTTGGCTTACGCATCGGGTGTCTCAATCAACAAAAAGAGTTAGCCATGGTCCATATGAATAT CCTCC
204_V2_AC2	CAGGCGGTGAATTTACTGCCGGAAG
UvrA Cmyc dans pgbuvrB UP	CGGAGTGCGAAGCATCACACAGGCACGCTTCTTAAGCCGATGCTGCTGGGTGGCGGTGGCTCTCGCGCG GCGGAAC
UvrA Cmyc dans pgbuvrB DO	TGCTGGTGCAACTCTGAAAGGAAAAGCCGCTCAGAAAGCGGCCTTAACGAATCTTCCGTCACAGGTAGGC GCGCCG

Annexe 4 Analyse de la synchronisation en cytométrie en flux après 20 min de MMC



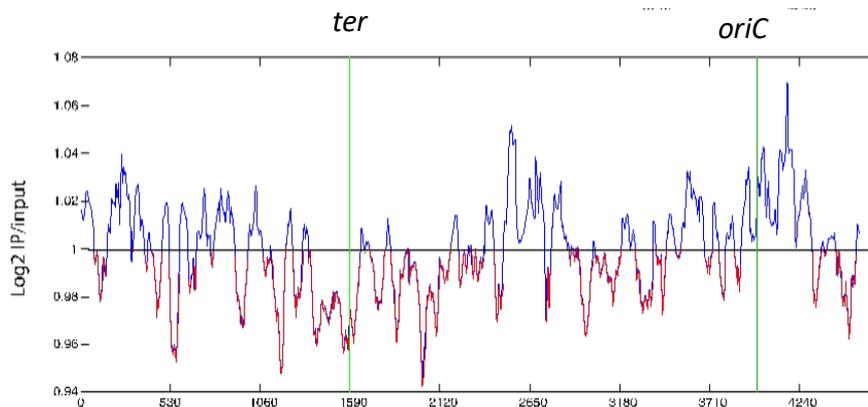
Vérification de la synchronisation des souches DnaC^{TS} en dénombrant la quantité d'ADN/cellule. Pour les contrôles, j'ai utilisé la souche MG1655 DnaC^{TS} en phase stationnaire de croissance de plus de 24h marquée et non marquée, ou en phase exponentielle à 37°C en MMA (casa 0.2%, glucose 0.2%). Les souches DnaC^{TS} sont synchronisées 90 min à 39-42°C. Le marquage du nucléoïde est réalisé à l'iodure de propidium : 10 µg/ml ou au DAPI 1 µg/ml (après traitement RNase(A), avec 1 ml de culture à DO₆₀₀: 0,15 soit environ 1.10⁸ UFC/mL. Fixation 1h à 4°C dans une solution d'éthanol à 67% final avec du Tris HCL pH 7,4 10mM, après un premier lavage au PBS (6 000 x g 5 min). Pour le passage au FACS, les cellules ont été diluées au 1/20.

Annexe 5 Analyse de la synchronisation en cytométrie de flux après 10 min de MMC



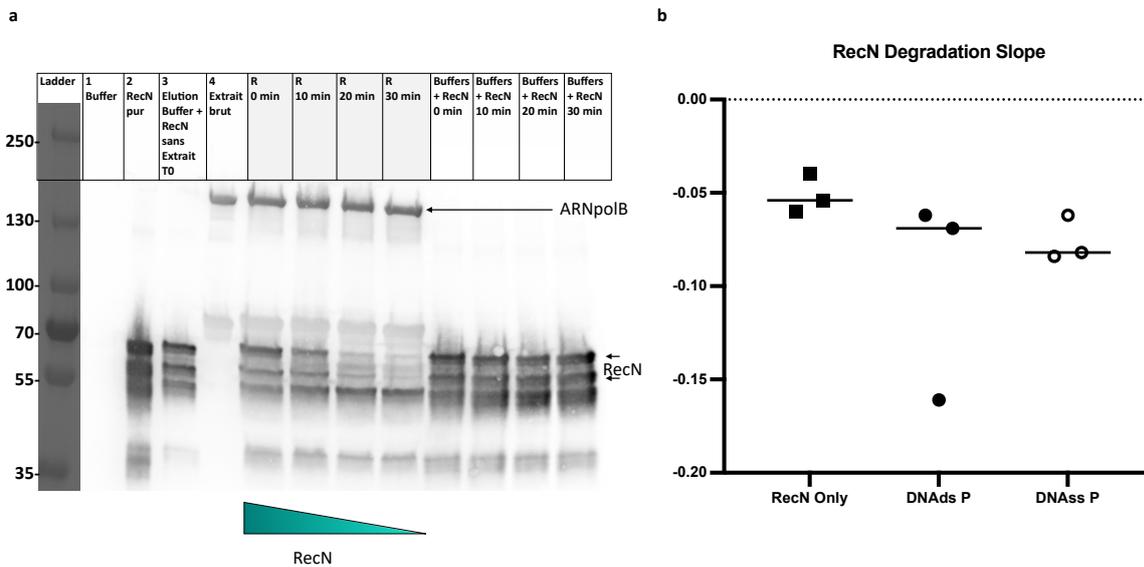
Vérification de la synchronisation des souches DnaC^{TS} en dénombrant la quantité d'ADN/cellule dans les mêmes conditions que précédemment. Induction du stress génotoxique 10 min en MMC.

Annexe 6 Enrichissement des fractions immuno précipitées Chip-Seq de RecN-3XF



Les cellules ont été synchronisées 90 min à 39°C, puis la reprise de la réplication a été permise durant 23 min à 30°C en milieu MMA. Le traitement à la MMC 20 min à 10 µg/ml. IP la fraction d'ADN immunoprécipité, l' "input" la fraction d'ADN non immunoprécipité. Cette expérimentation a été réalisée en tripliquât biologique. L'abscisse représente la région du génome linéairement en kpb. Taux d'enrichissement (supérieur à 1) des régions de l'ADN.

Annexe 7 Test de dégradation de RecN *in vitro*



a. Western-Blot d'une des expérimentations contrôle. 1 :le buffer d'énergie contenant l'ATP. 2 : l'extrait purifié de RecN. 3 l'extrait purifié de RecN avec le tampon (« buffer ») d'énergie. 4 : l'extrait protéique d'*E. coli* avec les protéases fonctionnelles où l'ARNpolymerase-Bêta est visiblement marqué, mais aucune trace de RecN n'est visible. Ceci confirme que la réponse SOS n'a pas été induite au moment de récupérer les échantillons pour la préparation des extraits. R0 min à R30 min représente le mélange réactionnel placé à 30°C, prélevé toutes les 10 min. Les puits « Buffer + RecN » représentent les mixes identiques aux puits « R », sans l'extrait protéique d'*E. coli* prélevé toutes les 10 min. Il n'y a pas de dégradation spontanée de RecN durant l'expérience, confirmant que la fraction qui disparaît provient de l'effet de l'extrait protéique d'*E. coli*. **b.** Pour 3 tripliquats, la vitesse de dégradation de RecN, au cours des 30 min, évalué par WB, a été calculée puis représentée sur la graphique en fonction du type de substrat ajouté. L'ADNdb P pour circulaire, l'ADNsb circulaire. Les expérimentations test avec UvrA, UvrB, UvrC, RecA, ou un mélange des différentes combinaisons ne sont pas présentés.

Annexe 8 Scripts Hi-SC2 : conversion des données brutes de séquençages

```
function sam2wig
% Converts samfiles to an equivalent of wig files
%
% Samfile features of interest:
% - values for forward(0) or reverse(16) read
% - replicon name (chr1, chr2, chr3...)
% - position of the first base of the motif
% - motif sequence
% - nb of motif finds in the reference genome:
%     qual>=20 && XT:A:U && NM:i:0 uniquely mapped read with perfect
match
%     qual==0 && XT:A:R multiply mapped read
%
% For each good quality unique read, add +1 at the genomic position of the
% read start, taking into account the orientation of the read and the
length of the sequence fragments
%     Fwd read: pos+readlength-1
%     Rev read: pos
%
% Returns:
% - reads, nb of uniquely mapped good quality reads at each genomic
% position: column 1 = Fwd reads (16), column 2= reverse reads (0)
% - nbreads, total nb of reads
% - unreads, nb of uniquely mapped good quality reads
% - mureads, nb of multiple reads
% - otreads, nb of other type of reads
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% Get samfile PathName and samName
disp('select sam file (*.sam)')
[Name,PathName]=uigetfile('*.sam','MultiSelect','on','title','select sam
file (*.sam data)');
if isequal(Name,0) || isequal(PathName,0)
    warndlg('User pressed cancel')
    return
end
if ischar(Name)
    samName=cell(1,1);
    samName{1}=Name;
else
    samName=Name;
end
clear Name

%% for each samfile do:
for n=1:numel(samName)
    disp(samName{n})
    % read headerlines
    disp(' Reading HeaderLines')
    nbheaderlines=0;
    nbrep=0;
    samfile{1} = '@';
    fid = fopen(strcat(PathName,samName{n}));
```

```

while contains(samfile{1},'@')
    samfile = textscan(fid, '%s %s %s[^\n]');
    if contains(samfile{1},'@')
        nbheaderlines=nbheaderlines+1;
    end
    if contains(samfile{2},'SN:') && contains(samfile{3},'LN:')
        nbrep=nbrep+1;
    end
end
fclose(fid);
disp(['  Nb of headerlines: ', num2str(nbheaderlines)])
disp(['  Nb of replicons:   ', num2str(nbrep)])
% get replicons' lengths
disp(' Replicons' ' lengths')
reads=cell(1,nbrep);
nbrep=0;
fid = fopen(strcat(PathName,samName{n}));
for nbh=1:nbheaderlines
    samfile = textscan(fid, '%s %s %s[^\n]');
    if contains(samfile{2},'SN:') && contains(samfile{3},'LN:')
        nbrep=nbrep+1;
        name=samfile{2}{1}(4:end);
        reads{nbrep}=zeros(int32(str2double(samfile{3}{1}(4:end))),2);
        disp(['    ',name,': ', num2str(size(reads{nbrep},1))])
    end
end
fclose(fid);
% read sam data {1} ; {2} ; {3} ; {4} ; {5} ; {6}; {7}
% 0 or 16; replicon; first base of the motif; sequence quality; motif;
% unique 'XT:A:U' or multiple 'XT:A:R' ; perfect alignment 'NM:i:0'
disp(' Reading Samfile')
fid = fopen(strcat(PathName,samName{n}));
samfile = textscan(fid, '%*s %f %s %f %f %*s %*s %*s %*s %s %*s %s %s
%*[^\\n]', 'HeaderLines',nbheaderlines);
fclose(fid);
disp(' Reading done')
% analyse data
disp(' Recovering unique perfect reads')
nbreads=size(samfile{1},1);
disp(['  nbreads= ' num2str(nbreads)])
unreads=0;
for i=1:nbreads
    if samfile{4}(i)>=20 && contains(samfile{6}{i},'XT:A:U') &&
contains(samfile{7}{i},'NM:i:0')
        unreads=unreads+1;
        ChNb=str2double(samfile{2}{i}(4:end));
        if samfile{1}(i)==0
            pos=samfile{3}(i)+length(samfile{5}{i})-1;
            reads{ChNb}(pos,1)=reads{ChNb}(pos,1)+1;
        elseif samfile{1}(i)==16
            pos=samfile{3}(i);
            reads{ChNb}(pos,2)=reads{ChNb}(pos,2)+1;
        end
    end
end
end

```



```

disp([' unique reads= ' num2str(unreads)])
disp(' Recovery done')
% save wig file
save(strcat(PathName,samName{n}(1:end-4),'_wig.mat'),'reads',
'nbreads');
end
end

```

Annexe 9 Scripts Hi-SC2 : comptage du nombre de sites *LoxP* total et recombinés

```

function [tot,rec]=combineSC2(Fastqname)
% Function to combine in a unique file the two datafiles generated by the
% sam2wig.mat script
%
% Two datafiles must be loaded:
% * samplename_tot_wig.mat
% * samplename_rec_wig.mat
%
% The function will create a new file with two different cell list:
% * 'tot': reads from samplename_tot.wig
% * 'rec': reads from samplename_rec.wig
%
% Once the samples are loaded,a new metadata table will appear in the
command
% window. Fill it with the information about the sample:
% - SSR system: refers to cre loxP system.
% - Growth medium: refers to the conditions used for the recombination
% assay
% - Temperature: refers to the conditions used for the recombination
% assay
% - Drugs: in case of addition of antibiotics or any other compound during
% the experiment
% - Timepoint: period of time sample was induced
% - Inducer: arabinose concentration used
% This information will be stored in the name of the file.
% The box is already prefilled, change accordingly with the experiment
%
% In case function is not working:
% * Both files must be loaded at the same time. If one of the files is
% missing Matlab shows the following warning messages in the command
window:
% - 'There was no total data file' in case of samplename_tot.wig is
% missing
% - 'There was no recombinated data file' in case of samplename_rec.wig is
% missing
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
%%
[WigName,PathName]=uigetfile({strcat(Fastqname,'*_WIG*.mat');strcat(Fastqname,'*_wig*.mat')}, ['select rec and total reads for ' Fastqname ' data'],
'MultiSelect','on');
if ischar(WigName) || ~(numel(WigName)==2)
    warndlg('2 wig files must be selected: 1 recombinated and 1
total')

```

```

    return
else
    isrec=0;
    istot=0;
    for k=1:numel(WigName)
        l=load(strcat(PathName,WigName{k}));
        if contains(upper(WigName{k}),'REC')
            rec=l.reads;
            isrec=1;
        elseif contains(upper(WigName{k}),'TOT')
            tot=l.reads;
            istot=1;
        end
    end
end
if isrec==1 && istot==1
    prompt = {'SSR system:',...
              'Growth medium:',...
              'Temperature:',...
              'Drugs:',...
              'Timepoint:',...
              'Inducer:',...
              };
    dlg_title = 'SC2 assay conditions';
    num_lines = 1;
    def = {'Creloxp',...
           'MM',...
           '30',...
           'noDrugs',...
           '0',...
           'ara0.02',...
           };
    answer = inputdlg(prompt,dlg_title,num_lines,def,'on');
    savename=strcat(PathName,'/',Fastqname);
    for n=1:numel(answer)
        savename=strcat(savename,'_',answer{n});
    end
    savename=strcat(savename,'_SC2.mat');
    save(savename,'rec','tot')
elseif isrec==0
    warndlg('There was no recombined data file')
    return
elseif istot==0
    warndlg('There was no total data file')
    return
end
end
%%
end

```

Annexe 10 Scripts Hi-SC2 : création des graphiques.

```

function CreateGenomeFile
%% Get parameters
prompt = {'Genome file name:',...
         'Features:',...
         };
dlg_title = 'Strain's genome descriptors';
num_lines = 1;
def = {'MG1655_1_9.mat',...

'SC2,CDS,zero,five,ten,fifteen,twenty,twentyFive,thirty,thirtyFive,forty,f
ortyFive'};
answer = inputdlg(prompt,dlg_title,num_lines,def,'on');
if ~isempty(answer)
    Strain=answer{1};
    if contains(Strain, '.mat')
        StrainName=Strain(1:end-4);
    else
        StrainName=Strain;
    end
    featuretags=ReadStrings(answer{2},',');
else
    disp('User pressed cancel')
    return
end
clear def answer dlg_title prompt num_lines

%% get genome file and/or create genome file
replicon=[];
feature=[];
SC2=struct;
if contains(Strain, '.mat')

[File,PathName]=uigetfile({'Strain;strcat('*',StrainName,'*.mat')},'select
genome file');
    if ~isempty(File)
        l=load(strcat(PathName,File));
        names=fieldnames(l);
        for n=1:numel(names)
            switch names{n}
                case 'replicon'
                    replicon=l.(names{n});
                case 'ch'
                    replicon=l.(names{n});
                case 'feature'
                    feature=l.(names{n});
                case 'SC2'
                    SC2=l.(names{n});
            end
        end
    else
        disp('User pressed cancel')
        return
    end
else

```

```

[name,PathName]=uigetfile({strcat(StrainName,'*_seq*.txt');'*_seq*.txt'},'
select replicon sequence text files','multiselect','on');
if ~isempty(name)
    if ischar(name)
        File=cell(1,1);
        File{1}=name;
    else
        File=cell(1,numel(name));
        for i=1:numel(File)

chrnb=str2double(name{i}(strfind(lower(name{i}),'chr')+3:strfind(lower(nam
e{i}),'_seq')-1));
            File{chrnb}=name{i};
        end
    end
    % create replicon cell list
    replicon=create_replicons(PathName,File);
else
    disp('User pressed cancel')
    return
end
end

%% Get Feature Data
for featnb=1:numel(featuretags)
    disp(['  searching for ' featuretags{featnb}])
    switch featuretags{featnb}
        case 'CDS'
            [replicon,feature]=get_CDSvs2(replicon,feature);
            if ~numel(feature.CDS)==size(replicon,2)
                warndlg('CDS file number and replicon number are not
equal')
            end
            return
        case 'oriC'
            if ~isfield(feature,'oriC') || (isfield(feature,'oriC') &&
~isequal(feature.oriC,'GATCTATTTATTTAGAGATCTGTTCTATTGTGATCTCTTATTAGGATCGCA
CTGCCCTGTGGATAACAAGGATCCGGCTTTTAAGATCAACAACCTGGAAAGGATCATTAAGTGTGAATGATCGG
TGATCCTGGACCGTATAAGCTGGGATCAGAATGAGGGGTTATACACAACCTCAAAAAGTGAACAACAGTTGTTCT
TTGGATAACTACCGGTTGATCCAAGCTTCCTG'))
                disp('oriC')

[replicon,feature]=get_MotifLocation(replicon,feature,'oriC','GATCTATTTATT
TAGAGATCTGTTCTATTGTGATCTCTTATTAGGATCGCACTGCCCTGTGGATAACAAGGATCCGGCTTTTAAGA
TCAACAACCTGGAAAGGATCATTAAGTGTGAATGATCGGTGATCCTGGACCGTATAAGCTGGGATCAGAATGAG
GGGTTATACACAACCTCAAAAAGTGAACAACAGTTGTTCTTTGGATAACTACCGGTTGATCCAAGCTTCCTG');
            end
        case 'zero'
            if ~isfield(feature,'zero') || (isfield(feature,'zero') &&
~isequal(feature.zero,'CTTTTCATTCTGACTGCAACGGGCAATATGTCTCTGTGTGGATTAACAAAAA
GAGTGTCTGATAGCAGCTTCTGAACTGGTTAC'))
                disp('zero')
            end
        end
    end
end

```

```
[replicon, feature]=get_MotifLocation(replicon, feature, 'zero', 'CTTTTCATTCTG
ACTGCAACGGGCAATATGTCTCTGTGTGGATTAAAAAAGAGTGTCTGATAGCAGCTTCTGAACTGGTTAC');
    end
    case 'five'
        if ~isfield(feature, 'five') || (isfield(feature, 'five') &&
~isequal(feature.five, 'ATAAGGTCCAGAACAGGTAGTTTGTTCCTCCGGCTTCATACAAAACTCCTT
TCAAATTACGTCATTGTAA'))
            disp('five')

[replicon, feature]=get_MotifLocation(replicon, feature, 'five', 'ATAAGGTCCAGA
ACAGGTAGTTTGTTCCTCCGGCTTCATACAAAACTCCTTCAAATTACGTCATTGTAA');
    end
    case 'ten'
        if ~isfield(feature, 'ten') || (isfield(feature, 'ten') &&
~isequal(feature.ten, 'GGTGATGATTATACTGCAGGCGATTTTTTCGATAGTGTGTCAGCTTTCGTGGTG
TGCAGCTGGCGT'))
            disp('ten')

[replicon, feature]=get_MotifLocation(replicon, feature, 'ten', 'GGTGATGATTATA
CTGCAGGCGATTTTTTCGATAGTGTGTCAGCTTTCGTGGTGTCAGCTGGCGT');
    end
    case 'fifteen'
        if ~isfield(feature, 'fifteen') || (isfield(feature, 'fifteen')
&&
~isequal(feature.fifteen, 'CGCTAACCTTGCAGGATCATAAATTTGGAGCAGGAGTTGATGGTCGG
GCGTTAAGCCTTGTGCGGCGACGATC'))
            disp('fifteen')

[replicon, feature]=get_MotifLocation(replicon, feature, 'fifteen', 'CGCTAACCC
TTGCAGGATCATAAATTTGGAGCAGGAGTTGATGGTCGGGCGTTAAGCCTTGTGCGGCGACGATC');
    end
    case 'twenty'
        if ~isfield(feature, 'twenty') || (isfield(feature, 'twenty') &&
~isequal(feature.twenty, 'TGCCTTCGTTACCTTTTTTACCAGCGCCTGAATACCAGAAATGGTGTA
CGGGGTTGAGAAATCGT'))
            disp('twenty')

[replicon, feature]=get_MotifLocation(replicon, feature, 'twenty', 'TGCCTTCGTT
ACCTTTTTTACCAGCGCCTGAATACCAGAAATGGTGACGGGGTTGAGAAATCGT');
    end
    case 'twentyFive'
        if ~isfield(feature, 'twentyFive') ||
(isfield(feature, 'twentyFive') &&
~isequal(feature.twentyFive, 'GCTTTGGTGACAAGCTGACGGTTATCTATGATATTGATGAAGAGG
TGAATTGCTGCATTCCCAGCCTGCTGATCC'))
            disp('twentyFive')

[replicon, feature]=get_MotifLocation(replicon, feature, 'twentyFive', 'GCTTTG
GTGACAAGCTGACGGTTATCTATGATATTGATGAAGAGGTGAATTGCTGCATTCCCAGCCTGCTGATCC');
    end
    case 'thirty'
```

```

&&
~isequal(feature.thirty, 'AAAAACGTGGTAATAGAGAAAGAGGTTAATTTTCATTTGGCAAAGGGAAG
TATCATCAGCAAAATAT'))
    disp('thirty')

[replicon, feature]=get_MotifLocation(replicon, feature, 'thirty', 'AAAAACGTGG
TAATAGAGAAAGAGGTTAATTTTCATTTGGCAAAGGGAAGTATCATCAGCAAAATAT');
    end
    case 'thirtyFive'
        if ~isfield(feature, 'thirtyFive') ||
(isfield(feature, 'thirtyFive') &&
~isequal(feature.thirtyFive, 'GGACAACCGTCGGCTCCGGTATTTTTGTATCTGTGGGTGAAGTGG
CAAAAGCAGCGGGCAGCCGTGGCTTA'))
            disp('thirtyFive')

[replicon, feature]=get_MotifLocation(replicon, feature, 'thirtyFive', 'GGACAA
CCGTCCGGCTCCGGTATTTTTGTATCTGTGGGTGAAGTGGCAAAGCAGCGGGCAGCCGTGGCTTA');
    end
    case 'forty'
        if ~isfield(feature, 'forty') || (isfield(feature, 'forty') &&
~isequal(feature.forty, 'ATGGTCGAGAACGACAGCGGCTACAAGCTCGGCCAGCGCGTACGCCACGC
TAAGTTTGGTGAAGGCACCATTTGT'))
            disp('forty')

[replicon, feature]=get_MotifLocation(replicon, feature, 'forty', 'ATGGTCGAGAA
CGACAGCGGCTACAAGCTCGGCCAGCGCGTACGCCACGCTAAGTTTGGTGAAGGCACCATTTGT');
    end
    case 'fortyFive'
        if ~isfield(feature, 'fortyFive') ||
(isfield(feature, 'fortyFive') &&
~isequal(feature.fortyFive, 'AAAGTTATCCAGTTTACTGATGCTGGCGAGGTAACAGGCAATTTTT
CGGGGATACTGCTCCAGGTAATTATTC'))
            disp('fortyFive')

[replicon, feature]=get_MotifLocation(replicon, feature, 'fortyFive', 'AAAGTTA
TCCAGTTTACTGATGCTGGCGAGGTAACAGGCAATTTTTCGGGGATACTGCTCCAGGTAATTATTC');
    end
    case 'dif'
        if ~isfield(feature, 'dif') || (isfield(feature, 'dif') &&
~isequal(feature.oriC, 'ATTTAACATAATATACATTATGCGCACC'))
            disp('dif')

[replicon, feature]=get_MotifLocation(replicon, feature, 'dif', 'ATTTAACATAATA
TACATTATGCGCACC');
    end

    % case 'GATC'
    %     if ~isfield(feature, 'GATC') || (isfield(feature, 'GATC') &&
~isequal(feature.GATC, 'GATC'))
    %
[replicon, feature]=get_MotifLocation(replicon, feature, 'GATC', 'GATC');
    %     end
%

```

```

%
% (1) Store in feature.CDS the names of the strain replicons GB files
% (2) Recover an store in replicon{n}.CDS the name, orientation & position
of each CDS
% (3) Find and store in replicon{n}.IG the name, orientation & position of
each CDS and intergenic region
% (4) Combine and store in replicon{n}.IGC the name, orientation &
position of each combined IG&CDS region
%
% recover CdsFile name and path
[CdsFileName,PathName]=uigetfile('*_cds*.txt','Select the replicon CDS
files (Genbank format)','multiselect','on');
if PathName==0
    disp('User pressed cancel')
    return
end
if ischar(CdsFileName)
    CdsFile=cell(1,1);
    CdsFile{1}=CdsFileName;
else
    CdsFile=cell(1,numel(CdsFileName));
    for i=1:numel(CdsFileName)
        key=strfind(lower(CdsFileName{i}),'chr');
        chrnb=sscanf(CdsFileName{i}(key+3:end), '%g');
        CdsFile{chnrb}=CdsFileName{i};
    end
end
end
% check correct nb of CdsFile
if ~numel(CdsFile)==size(replicon,2)
    warndlg('CDS file number and replicon number are not equal')
    return
end
% Store CdsFile names
feature.CDS=CdsFileName;
% Scan each CdsFile for the name, position and orientation of the CDS
for k=1:size(replicon,2)
    disp(['Analysing replicon ' num2str(k) ' GenBank annotation file'])
    % get nb of CDS
    fid=fopen(strcat(PathName,CdsFile{k}));
    C=textscan(fid,'%s',1, 'Delimiter','\r');
    nb_CDS=0;
    while ~(~isempty(strfind(C{1}{1},'/')) && isequal(length(C{1}{1}),2))
        if strfind(C{1}{1},'CDS ')==1 % to ensure it is a 'CDS' tag and
not a CDS motif within the aa sequence of a protein
            C=textscan(fid,'%s',2, 'Delimiter','\r');
            if ~contains(C{1}{2},'recognition and cleavage')
                nb_CDS=nb_CDS+1;
            end
        end
        end
        C=textscan(fid,'%s',1, 'Delimiter','\r');
    end
    fclose(fid);
    disp(['    Number of CDS: ' num2str(nb_CDS)])
    replicon{k}.CDS=cell(nb_CDS,4);

```

```

C=textscan(fid,'%s',1, 'Delimiter','\r');
n=0;
while ~(~isempty(strfind(C{1}{1},'//')) && isequal(length(C{1}{1}),2))
    if strfind(C{1}{1},'CDS')==1
        C=textscan(C{1}{1},'%s');
        pos=C{1}{2};
        if contains(pos,'complement(')
            pos=pos(12:end-1);
            ori=-1;
        else
            ori=1;
        end
        idx=strfind(pos,'..');
        pos=[str2double(pos(1:idx(1))),str2double(pos(idx(1)+2:end))];
        C=textscan(fid,'%s',2, 'Delimiter','\r');
        if contains(C{1}{1},'/codon_start')
            if ~contains(C{1}{2},'recognition and cleavage')
                n=n+1;
                str=ReadStrings(C{1}{2},'');
                if contains(str{end},'-')
                    str=ReadStrings(str{end},'-');
                end
                replicon{k}.CDS(n,:)={str{end},ori,pos(1),pos(2)};
            end
        else
            n=n+1;
            str=ReadStrings(C{1}{1},'');
            replicon{k}.CDS(n,:)={str{end},ori,pos(1),pos(2)};
        end
    end
    C=textscan(fid,'%s',1, 'Delimiter','\r');
end
fclose(fid);
end
% Analyse and store Separated (IG+CDS) positions in replicon{k}.IG
for k=1:size(replicon,2)
    disp(['Adding replicon ' num2str(k) ' intergenic features'])
    nbIG=0;
    for n=1:size(replicon{k}.CDS,1)-1
        if replicon{k}.CDS{n,4}<replicon{k}.CDS{n+1,3}
            nbIG=nbIG+1;
        end
    end
    nbIG=nbIG+2; % +2 because of the possibility of an IG at the start of
the end of the genome sequence
    replicon{k}.IG=cell(nbIG+size(replicon{k}.CDS,1),4);
    if replicon{k}.CDS{1,2}==-1
        strIG='IG_ori';
        oriIG=-1;
        posIG=[1, replicon{k}.CDS{1,3}-1];
        replicon{k}.IG(1,:)={strIG,oriIG,posIG(1),posIG(2)};
    elseif replicon{k}.CDS{1,2}==1
        strIG=['IG_' replicon{k}.CDS{1,1}];

```

```

        replicon{k}.IG(1,:)={strIG,oriIG,posIG(1),posIG(2)};
    end
    nCDS=1;
    nfeat=2;
    replicon{k}.IG(2,:)=replicon{k}.CDS(1,:);
    if replicon{k}.CDS{nCDS,4}<replicon{k}.CDS{nCDS+1,3}
        nfeat=nfeat+1;
        strIG=['IG_' replicon{k}.CDS{nCDS,1}];
        oriIG=replicon{k}.CDS{nCDS,2};
        posIG=[replicon{k}.CDS{nCDS,4}+1,replicon{k}.CDS{nCDS+1,3}-1];
        replicon{k}.IG(nfeat,:)={strIG,oriIG,posIG(1),posIG(2)};
    end
    while nCDS<size(replicon{k}.CDS,1)-1
        nCDS=nCDS+1;
        nfeat=nfeat+1;
        if replicon{k}.CDS{nCDS,2}==-1
            if replicon{k}.CDS{nCDS-1,2}==1 && replicon{k}.CDS{nCDS-
1,4}<replicon{k}.CDS{nCDS,3}
                strIG=['Conv_' replicon{k}.CDS{nCDS-1,1} '_'
replicon{k}.CDS{nCDS,1}];
                oriIG=0;
                posIG=[replicon{k}.CDS{nCDS-
1,4}+1,replicon{k}.CDS{nCDS,3}-1];
                replicon{k}.IG(nfeat,:)={strIG,oriIG,posIG(1),posIG(2)};
                nfeat=nfeat+1;
            end
            replicon{k}.IG(nfeat,:)=replicon{k}.CDS(nCDS,:);
            if replicon{k}.CDS{nCDS,4}<replicon{k}.CDS{nCDS+1,3}
                nfeat=nfeat+1;
                strIG=['IG_' replicon{k}.CDS{nCDS,1}];
                oriIG=replicon{k}.CDS{nCDS,2};

posIG=[replicon{k}.CDS{nCDS,4}+1,replicon{k}.CDS{nCDS+1,3}-1];
                replicon{k}.IG(nfeat,:)={strIG,oriIG,posIG(1),posIG(2)};
            end
            elseif replicon{k}.CDS{nCDS,2}==1
                if replicon{k}.CDS{nCDS,3}>replicon{k}.CDS{nCDS-1,4}
                    strIG=['IG_' replicon{k}.CDS{nCDS,1}];
                    oriIG=replicon{k}.CDS{nCDS,2};
                    posIG=[replicon{k}.CDS{nCDS-
1,4}+1,replicon{k}.CDS{nCDS,3}-1];
                    replicon{k}.IG(nfeat,:)={strIG,oriIG,posIG(1),posIG(2)};
                    nfeat=nfeat+1;
                    replicon{k}.IG(nfeat,:)=replicon{k}.CDS(nCDS,:);
                else
                    replicon{k}.IG(nfeat,:)=replicon{k}.CDS(nCDS,:);
                end
            end
        end
    end
end
end

```

```

end
elseif ~contains(replicon{k}.IG{end,1}, 'IG_')
    nCDS=nCDS+1;
    replicon{k}.IGC(nCDS,1)={'IG_ori',
replicon{k}.IG{n,2},replicon{k}.IG{n,3},replicon{k}.IG{n,4}};
end
for n=2:size(replicon{k}.IG,1)-1
    if ~contains(replicon{k}.IG{n,1}, 'IG_')
        nCDS=nCDS+1;
        if replicon{k}.IG{n,2}== -1
            if contains(replicon{k}.IG{n+1,1},replicon{k}.IG{n,1})
                replicon{k}.IGC(nCDS,:)={'IG&'
replicon{k}.IG{n,1}},replicon{k}.IG{n,2},replicon{k}.IG{n,3},replicon{k}.I
G{n+1,4}};
            else
                replicon{k}.IGC(nCDS,:)=replicon{k}.IG(n,:);
            end
        elseif replicon{k}.IG{n,2}==1
            if contains(replicon{k}.IG{n-1,1},replicon{k}.IG{n,1})
                replicon{k}.IGC(nCDS,:)={'IG&'
replicon{k}.IG{n,1}},replicon{k}.IG{n,2},replicon{k}.IG{n-
1,3},replicon{k}.IG{n,4}};
            else
                replicon{k}.IGC(nCDS,:)=replicon{k}.IG(n,:);
            end
        elseif replicon{k}.IG{n,2}==0
            replicon{k}.IGC(nCDS,:)=replicon{k}.IG(n,:);
        end
    end
end
end
n=n+1;
if replicon{k}.IG{n,2}== -1 && contains(replicon{k}.IG{1,1}, 'IG_')
    if ~contains(replicon{k}.IG{n,1}, 'IG_')
        nCDS=nCDS+1;
        replicon{k}.IGC(nCDS,:)={'IG&'
replicon{k}.IG{n,1}},replicon{k}.IG{n,2},replicon{k}.IG{n-
1,3},replicon{k}.IG{n,4}};
        elseif contains(replicon{k}.IG{n,1}, 'IG_') &&
~contains(replicon{k}.IG{n-1,1}, 'IG_') && replicon{k}.IG{n-1,2}== -1
replicon{k}.IGC(nCDS,:)={replicon{k}.IGC{nCDS,1},replicon{k}.IGC{nCDS,2},r
eplicon{k}.IGC{nCDS,3},replicon{k}.IG{1,4}};
    end
end
end
end
end

```

```

% function [replicon, feature] =
get_RNAexpressionProfile(replicon, feature, chtags, ExpTag, Path, ExpFile)
% for k=1:size(replicon,2)
%     fid=fopen(strcat(Path,ExpFile));
%     C=textscan(fid, '%s %s %f', 'delimiter', '\t');
%     fclose(fid);
%     replicon{k}.(ExpTag)=replicon{k}.CDS;
%     replicon{k}.(ExpTag) (:,2)=zeros(size(replicon{k}.CDS,1),1);
%     for n=1:size(C{2},1)
%         for i=1:length(chtags)
%             if ~isempty(strfind(C{2}{n}, chtags{i}))
%                 genecode=str2double(C{2}{n}(end-3:end))/10000+i;
%             end
%         end
%     end
%     replicon{k}.(ExpTag)(replicon{k}.CDS(:,1)==genecode,2)=C{3}(n).*replicon{k}
%     }.CDS(replicon{k}.CDS(:,1)==genecode,2) ;
%     end
%     feature.(ExpTag)='';
% end
% end

function [replicon, feature]=get_MotifLocation(replicon, feature, name, motif)
% degenerate base code
code.G='G';
code.A='A';
code.T='T';
code.C='C';
code.U='U';
code.N='GATC';
code.R='GA';
code.Y='TC';
code.W='AT';
code.S='GC';
code.M='AC';
code.K='GT';
code.B='GTC';
code.D='GAT';
code.H='ATC';
code.V='GAC';
code_names=fieldnames(code);
% ensure upper case letters are used for consistency
motif=upper(motif);
% calculate number of different non-degenerate motifs to scan
nbstr=1;
for i=1:length(motif)
    for j=1:length(code_names)
        if isequal(motif(i), code_names{j})
            nbstr=nbstr*length(code.(code_names{j}));
        end
    end
end
end

```

```

% expand forward motif
exp_motif=cell(nbstr,2);
for j=1:nbstr
    exp_motif{j,1}=motif;
end
modulo=1;
for i=1:length(motif)
    for j=1:length(code_names)
        if isequal(motif(i), code_names{j})
            k=0;
            n=0;
            while k<nbstr
                n=n+1;
                if n>length(code.(code_names{j})), n=1; end
                for count=1:modulo
                    exp_motif{k+count,1}(i)=code.(code_names{j})(n);
                end
                k=k+modulo;
            end
            modulo=modulo*length(code.(code_names{j}));
        end
    end
end
% create reverse complement motifs
for j=1:size(exp_motif,1)
    rev=fliplr(exp_motif{j,1});
    for i=1:size(rev,2)
        switch upper(rev(i))
            case {'G'}
                rev(i)='C';
            case {'A'}
                rev(i)='T';
            case {'T'}
                rev(i)='A';
            case {'C'}
                rev(i)='G';
        end
    end
    exp_motif{j,2}=rev;
end
% eliminate redundant motifs
for j=1:size(exp_motif,1)
    for i=1:size(exp_motif)
        if isequal(exp_motif{j,1}, exp_motif{i,2})
            exp_motif{i,2}='';
        end
    end
end
end

```

```

% Search Motif locations
ismotif=0;
for k=1:size(replicon,2)
    if length(motif)<replicon{k}.l
        % circularize
        seq=[replicon{k}.seq replicon{k}.seq(1:length(motif)-1)];
        % get nb of motif locations
        nb_motif=0;
        for j=1:size(exp_motif,1)
            nb=length(strfind(seq, exp_motif{j,1}));
            if nb>0
                nb_motif=nb_motif+nb;
            end
            if ~isempty(exp_motif{j,2})
                nb=length(strfind(seq, exp_motif{j,2}));
                if nb>0
                    nb_motif=nb_motif+nb;
                end
            end
        end
        end
        if nb_motif>0
            ismotif=1;
            location=zeros(nb_motif,4);
            n=1;
            for j=1:nbstr
                p1=strfind(seq,exp_motif{j,1})';
                p2=p1+length(exp_motif{j,1})-1;
                ori=ones(size(p1,1),1);
                location(n:n+size(p1,1)-1,2:4)=[ori p1 p2];
                n=n+size(p1,1);
                p1=[];
                p2=[];
                ori=[];
                if ~isempty(exp_motif{j,2})
                    p1=strfind(seq,exp_motif{j,2})';
                    p2=p1+length(exp_motif{j,2})-1;
                    ori=-ones(size(p1,1),1);
                end
                location(n:n+length(p1)-1,2:4)=[ori p1 p2];
                n=n+size(p1,1);
            end
            idx=find(location(:,4)>replicon{k}.l);
            location(idx,4)=location(idx,4)-replicon{k}.l;
            [~,idx]=sort(location(:,3));
            location= location(idx,:);
            replicon{k}.(name)=int32(location);
        end
    end
end
end
if ismotif, feature.(name)=motif; end
end

```

```

% function
[replicon,feature]=get_LargeMotifLocation(replicon,feature,name,motif1,motif2)
% [rep,feat]=get_MotifLocation(replicon,feature,'motif1',motif1);
% [rep,~]=get_MotifLocation(rep,feat,'motif2',motif2);
% for k=1:numel(rep)
%     m=[];
%     if isfield(rep{k},'motif1') && isfield(rep{k},'motif2')
%         d=0;
%         n1=0;
%         while n1<size(rep{k}.motif1,1)
%             n1=n1+1;
%             n2=0;
%             while n2<size(rep{k}.motif2,1)
%                 n2=n2+1;
%                 [pos,~]=sort([rep{k}.motif1(n1,3) rep{k}.motif1(n1,4)
rep{k}.motif2(n2,3) rep{k}.motif2(n2,4)]);
%                 if pos(4)-pos(1)>d
%                     d=pos(4)-pos(1);
%                     m=[0 rep{k}.motif1(n1,2) pos(1) pos(4)];
%                 end
%             end
%         end
%     end
%     if ~isempty(m)
%         feature.(name)=strcat(motif1,'..',motif2);
%         replicon{k}.(name)=m;
%     end
% end
% end

```

Annexe 11 Poster congrès



RecN part of SOS response play a key role in sister chromatid cohesion and may have partners!

Adrien B. Camus^{1,2,3}, Elise Vickridge^{1,3}, Charlene Planchenaël¹, Isabel Garcia Junceda¹, Charlotte Cockram¹ and Olivier Espéli¹

¹ Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Collège de France, UMR CNRS-7241, INSERM U1050, 11 place Marcelin Berthelot, 75005 Paris, France
² Université PSL camus.adrien@college-de-france.fr; ³ Ligue Nationale Contre le Cancer



INTRODUCTION

RecN is a conserved structural maintenance of chromosomes (SMC)-like protein required for DNA double strand breaks (DSBs) repair in bacteria. RecN is induced after the formation of DSB by the SOS response. In bacteria, repair of replicative DNA DSBs mostly involves homologous recombination (HR) pathways between sister chromatids. We have demonstrated that in *E. coli* the repair of inter strand cross links (ICL) and subsequent DSBs, benefits from a prolonged sister chromatid cohesion (SCC) step and the regression of segregated chromosomes both mediated by RecN. Interestingly, absence of RecN can be rescued if sister chromatids are artificially attached through persistent catenation links. The absence of RecN also modifies RecA dynamics and reduces the SOS induction. To better characterize the role of RecN during ICL repair we searched for RecN partners. Co-immunoprecipitation experiments revealed interactions between RecN, UvrABC, RadA and RecA. Interaction between RecN and UvrABC is interesting because ICL repair also involves UvrABC (nucleotide excision repair (NER) pathway) but presumably at an earlier step than RecN. We observed that RecN mediated SCC is reduced in the absence of UvrB. We observed synergic effect of the double alteration of RecN and Uvr complex on the repair of ICL. Finally we observed that the amount of RecN is reduced in the absence of the Uvr complex upon MMC treatment but increased upon UV treatment. We propose therefore that, concerning RecN, the role of Uvr complex is to mediate its full induction, perhaps to help its loading on altered chromatids.

1- RecN participates in nucleoid rearrangement in response to DSBs

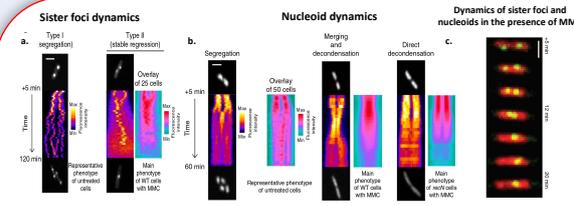
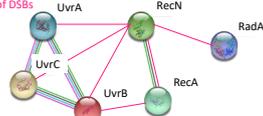


Figure 1. RecN Participates in sister locus re-pairing and nucleoid rearrangement in response to DSBs. a. Representative kymographs of sister focus dynamics in the absence or presence of MMC. Kymographs were constructed along the long axis of the cell. The Ice lookup kymographs are an overlay of kymographs. Time-lapse imaging starts 5 min after the initial contact with MMC. Images were acquired every 3 min for 2 h. The fire lookup kymographs represent a single cell. b. Representative kymographs of nucleoid (HU-mCherry) dynamics in the absence or presence of MMC. c. Dynamics of sister foci and nucleoids in the presence of MMC. A time course was performed in a strain tagged with a parSpMT1/ParB tag at ori-3 and labelled with HU-mCherry. *Elise Vickridge, et al 2017*

- RecN mediates merging of segregated sister foci upstream from a replication fork
- RecN mediated preservation of SCs, regression of segregated sister loci and nucleoid merging are coordinated steps in the repair process of DSBs

Interaction network of RecN revealed by co-IP experiments



2- RecN and UvrABC participate in SCCs in response to DSBs

Method : How to capture Sister Chromatid Interactions (SCIs)

We used a site-specific recombination technique between two *loxP* sites that were integrated into the chromosome. The higher the recombination frequency is, more the chromatids are cohesive.



Results: SCIs is dependent of UvrABC complex

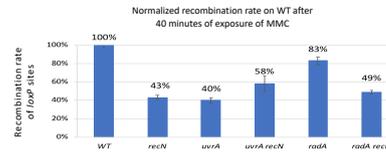
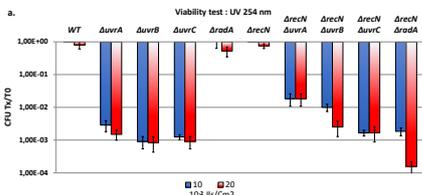


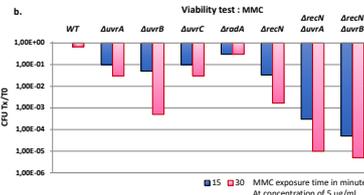
Figure 2. RecN and UvrABC are involved in sister chromatid cohesion induced by MMC. Measurement of sister chromatid cohesion in mutants, *recN*, *uvrA*, *uvrA recN*, *radA*. The results presented are after 40 minutes of exposure to MMC 10 µg/ml. The genotoxic stress is induced by addition of 10 µg/ml MMC to the culture medium at time 0. The ratio of the recombination rate was calculated as follows: (+ MMC/-MMC)Mutant/(+MMC/-MMC)WT.

- RecN is a major factor of sister chromatid cohesion when DSB are present on replicative chromosomes
- UvrABC complex is also required for sister chromatids cohesion

3- RecN could be involved in an independent pathway in UV repair



- UvrABC has a major effect on the viability in UV repair
- RecN mutant doesn't show a loss of viability
- RadA and RecN could intervene in repair paths for UV that offset each other



- RecN is essential for repair lesion induced with MMC
- Cumulative effect in the double mutants RecN and UvrABC

Figure 3. Effect of *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *radA*, *recN* mutations on viability under UV or MMC genotoxic stress conditions. Cell viability was normalized by Tx / T0. (Tx: cell number for a stress condition, and T0: the number of quantized cells in the original population). a. Each spot was irradiated with UV 254 nm at an intensity of 10² J/s/cm² (with n replicates, n = 2). Cell viability was measured after exposure of Mitomycin C (MMC) at 0, 15, and 30 min (5 µg/ml, n=1). *CFU:

4- UvrB plays a role in RecN dynamics

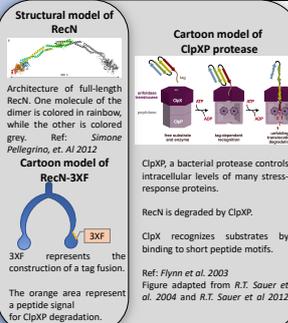
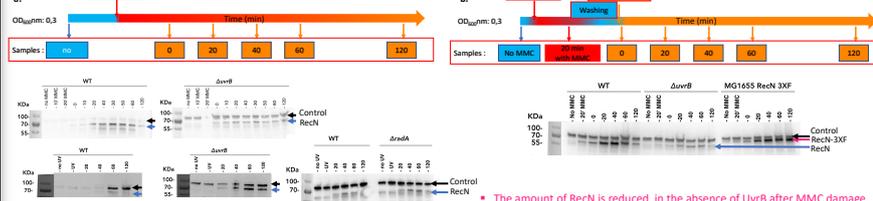


Figure 4. RecN dynamic in different mutants of SOS genes. RecN induction and persistence were examined. a. UV radiation 254 nm at an intensity of 10² J/s/cm² has been used or MMC (1µg/ml) as genotoxic agent. b. MMC (1µg/ml). Rifampicin has been added at concentration 100µg/ml to stop the mRNA synthesis. Deposit sample from cells protein extracts were standardized using Qubit 2.0 Fluorometer.



- In UV and MMC conditions RecN accumulates in *uvrB* mutant, probably due to its necessity to resolve unprocessed damages that are converted to DSB
- RadA has no impact on RecN dynamics in UV condition
- The amount of RecN is reduced in the absence of UvrB after MMC damage
- The induction of RecN is delayed in the absence of UvrB
- RecN-3XF which is preserved from degradation, accumulates over 120 min
- A fast induction of RecN is required to maintain sister chromatid cohesion

Conclusion and perspective

We have shown that in *E. coli* the repair of ICL and subsequent DSBs, benefits from a prolonged SCC step and the regression of segregated chromosomes both mediated by RecN. We have demonstrated SCC is dependent of UvrABC (NER pathway). This path is not known to intervene in HR. We demonstrate that RecN loss of interactions between sister chromatids in the absence of UvrA. It suggests that NER activity and sister chromatid dynamics control by RecN could be coupled, perhaps by direct interaction between UvrABC and RecN. We have demonstrated that the amount of RecN is reduced in absence of UvrB in MMC damage. All together, our results suggest that one of the function of UvrABC complex is to load RecN on DNA (as it is necessary for other cohesin) and may participate to the induction of SOS response. Furthermore, RadA, another unexpected partner of RecN showed that there is a synergy on the survival to genotoxic stress in UV damage. RadA is not part of SOS response and is not known to have a role in UV repair. The excess UV mortality revealed by the double mutant, suggests that RecN would also intervene in the UV repair in different pathways that would totally offset each other. The synergistic effect between RecN and RadA is therefore the first description in *E. coli* of a role of RecN in the repair of UV lesions. To go further we want to investigate RecN dynamics with a double-strand break which does not involve the ICL to get rid of NER pathway to target specifically the role of Uvr complex as partners and in the dynamics. We want to explore the dynamics of RecN around the replication forks at the double-strand break by the approaches of iPOND.

Annexe 12 Poster de vulgarisation scientifique pour la fête de la science



Bactéries : ce monde invisible qui nous entoure !

Laboratoire : Organisation et dynamique du chromosome chez les bactéries
Membres : Adrien Camus, Emma Bruder, Parul Singh, Nicole Quenech'Du, Sylvie Rimsky, et Olivier Espéi



Différentes formes de bactéries



Au laboratoire nous étudions la bactérie *Escherichia coli* qui a une morphologie de bacille



Image microscopique d'*Escherichia coli*

La nourriture



Le corps humain



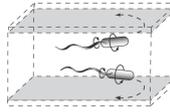
Différentes niches écologiques



L'environnement

Deux styles de vie

Mode de vie planctonique



- Seule
- Mobile grâce à leur(s) flagelle(s)
- Non adhérentes

Mode de vie sessile

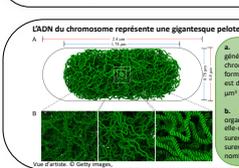
Biofilm



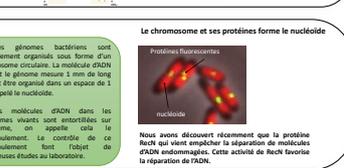
- En communauté multicellulaire
- Non mobile
- Adhérentes entre elles
- Sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice

Différentes stratégies de survie :
Quand l'ADN est endommagé, des systèmes de réparation sont mis en place. Ils impliquent une réorganisation spatiale du chromosome bactérien.

L'ADN c'est quoi ?
L'acide désoxyribonucléique est une molécule en double hélice située dans chacune des cellules vivantes.
Elle porte le programme : l'information génétique qui est composée d'un enchaînement de nucléotides.

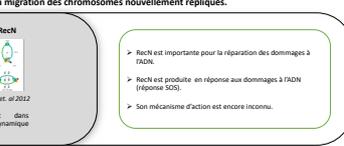


La structure de l'ADN en double hélice antiparallèle est composée de nucléotides.
Appariement des bases dans l'ADN. Deux liaisons hydrogène relient T à A ; trois liaisons hydrogènes relient G à C. Les squelettes sucre-phosphate (en gris) sont antiparallèles l'un à l'autre, de sorte que les extrémités 3' et 5' des deux brins sont alignées. Figure inspirée de Nature Education 2013 créée avec BioRender.



La bactérie peut devenir géante quand leurs ADN est endommagé
Structure de RecN
RecN intervient dans l'organisation et la dynamique du chromosome.
Ref: Smirnov Polyakov, et al 2012

Le chromosome et ses protéines forme le nucléoïde
Les gènes bactériens sont généralement organisés sous forme d'un chromosome circulaire. La molécule d'ADN formant le génome mesure 1 mm de long et doit être organisée dans un espace de 1 µm³ appelé le nucléoïde.
Les molécules d'ADN dans les organismes vivants sont entourées sur elle-même, on appelle cela le sur-enroulement. Le contrôle de ce sur-enroulement fait l'objet de nombreuses études au laboratoire.
Nous avons découvert récemment que la protéine RecN qui vient empêcher la séparation de molécules d'ADN endommagées. Cette activité de RecN favorise la réparation de l'ADN.

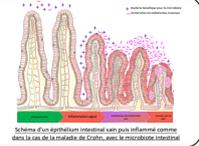


Nous étudions le mécanisme par lequel RecN bloque la migration des chromosomes nouvellement répliqués.

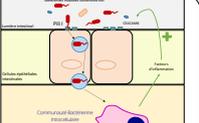
- RecN est importante pour la réparation des dommages à l'ADN.
- RecN est produite en réponse aux dommages à l'ADN (réponse SOS).
- Son mécanisme d'action est encore inconnu.

Etudier les bactéries impliquées dans la maladie de Crohn

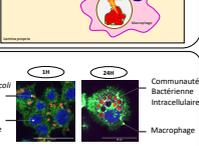
La maladie de Crohn
La maladie de Crohn est une **maladie inflammatoire chronique** pouvant toucher tous les segments du tube digestif. Cette maladie est multifactorielle : combinant des facteurs environnementaux et génétiques, et se caractérise par une inflammation de la paroi de l'intestin.
La paroi de l'intestin, que l'on appelle **épithélium**, est normalement recouverte de bactéries qui protègent les cellules et assurent une bonne digestion des aliments. L'ensemble de ces bactéries représente le **microbiote intestinal**.
Chez un patient atteint de la maladie de Crohn l'inflammation va entraîner un déséquilibre du microbiote. On retrouve un appauvrissement de bactéries favorables et un enrichissement de bactéries défavorables comme les **Escherichia coli Adhérentes Invasives (AIEC)**.



Les Escherichia coli Adhérentes Invasives (AIEC)
Les *Escherichia coli* Adhérentes Invasives se retrouvent en surnombre au niveau des cellules de l'intestin. Elles sont capables d'**adhérer aux cellules, puis de traverser l'épithélium**. Les bactéries se retrouvent en contact avec des cellules immunitaires que l'on appelle **macrophages**.
Les macrophages sont les cellules de première ligne du système immunitaire. Elles défendent l'organisme face aux corps étrangers. Les macrophages sont capables de reconnaître les micro-organismes, de les capturer dans une vacuole et de les détruire. Mais les AIEC ont la capacité surprenante de **survivre dans les macrophages** !



Au laboratoire, on étudie l'adaptation des AIEC dans les macrophages. On a montré que les bactéries forment des **Communautés Bactérienne Intracellulaire** protégée par une matrice dans la vacuole du macrophage. Elles y survivent en adoptant un mode de vie sous forme de **biofilm** !
Comment on étudie les AIEC au laboratoire ?
Pour étudier les AIEC dans les macrophages, nous utilisons des rapporteurs fluorescents (ici rouge) qui nous permettent de détecter les bactéries dans les macrophages à l'aide d'un microscope.
On étudie aussi le développement des biofilms sur milieu solide. Dans le milieu on ajoute des indicateurs colorés qui permettent de définir la composition de la matrice du biofilm.



Afin de préserver leur niche de vie, les bactéries produisent et sécrètent des antibiotiques avec des propriétés génotoxiques. Divers processus moléculaires maintiennent l'intégrité génomique de tous les organismes vivants. Ces événements sont primordiaux car la structure de l'ADN est endommagée en permanence par le métabolisme cellulaire (tel que le stress oxydatif ou lors de sa réplication), ou d'autres agents de l'environnement. Les antibiotiques sont utilisés pour des applications cliniques afin de traiter les infections ou le cancer.

Dans le travail ici présenté, nous analysons la réponse au stress génomique (GSR) induit par deux antibiotiques génotoxiques : la Bléomycine (BLM) et la Mitomycine-C (MMC). Ces deux antibiotiques altèrent l'ADN de différentes manières tout en conduisant à des cassures doubles brins (DSB). Les DSB sont suspectées d'être la cause principale de la mort cellulaire. Les DSB sont réparées par recombinaison homologue (HR). Des études récentes ont révélé que la HR est essentielle pour survivre aux lésions causées par la BLM et la MMC. Les premiers travaux sur le sujet, ainsi que les premiers modèles présentés dans les livres d'éducation, attribuent une voie de réparation particulière, selon le type de lésion à l'ADN.

La protéine RecN, induite par le régulateur SOS, joue un rôle important dans la réparation de l'ADN et le traitement des lésions générées par ces deux antibiotiques. Cependant, la fonction de RecN dans ces deux processus n'est pas clairement comprise. RecN est une protéine qui joue un rôle dans la maintenance structurelle du chromosome (SMC). Elle se lie sur de l'ADN simple brin (ADNsb) (et qui peut attraper une seconde molécule d'ADN ?). *In vitro*, RecN stimule la ligation de molécules d'ADN. *In vivo*, RecN arrête la ségrégation des chromatides sœurs, et induit une compaction extrême du nucléoïde. La sur-expression de RecN est toxique pour les cellules et son niveau est régulé par l'enzyme ClpXP, faisant partie du protéasome. RecN interagit avec RecA, toutes deux sont requises pour survivre aux DSB induites par l'endonucléase I-SCE 1. Elles sont généralement associées dans le même groupe épistatique. Des résultats récents suggèrent que RecA et RecN pourraient également avoir des voies d'actions distinctes, toutes deux importantes pour la réparation de l'ADN. Dans l'étude que l'on présente, nous avons utilisé à notre avantage, son implication dans le processus de réparation de deux types de lésions, pour questionner l'implication de RecN dans la réponse génomique au stress (GSR).

Nous avons démontré que la dynamique des chromatides sœurs et que le changement de conformation du nucléoïde induit par RecN, est différent selon l'antibiotique utilisé. En présence de lésions induites par la MMC, RecN est requise en pré-traitement des lésions par « réparation par excision de nucléotide » (NER), et son activité sur les chromatides sœurs se manifeste tôt dans le processus de réparation. A l'inverse, en présence de lésions induites par la BLM, l'activité de RecN ne nécessite pas de traitement par le NER, et se manifeste plus tard, durant les phases de récupération. L'analyse par transposition insertion (TIS) a révélé que *recN* est un des rares gènes du SOS impliqué dans le GSR des deux antibiotiques. L'absence de RecN perturbe grandement le GSR, notamment par l'augmentation de la pression sur le système de réparation par excision de base (BER), tout en réduisant l'importance de la HR. L'analyse du TIS a également mis en évidence, l'implication extrême de multiples voies telles que : les pompes à efflux, la gestion du stress oxydatif, et le contrôle du cycle cellulaire, pour permettre une récupération de l'altération des dommages à l'ADN. L'activité de RecN est un point de bascule entre différentes solutions de réparation. Plus généralement, ce travail illustre que le GSR est un processus intégré que la cellule déploie pour générer les conditions de sa survie.

MOTS CLÉS

***Escherichia coli*, RecN, Recombinaison homologue, cohésion des chromatides sœurs, Bléomycine, Mitomycine-C, Réparation par excision de nucléotides.**

ABSTRACT

To preserve their niche, bacteria frequently produce and secrete antibiotics with genotoxic properties. Molecular processes that maintain genomic integrity are essential for all organisms. This is necessary because DNA damage can arise during every round of genome duplications. These antibiotics have been used for clinical application to treat infections or cancers.

In the present work, we analyzed the Genomic Stress Response (GSR) induced by two genotoxic antibiotics: Bleomycin (BLM) and Mitomycin C (MMC). Although MMC and BLM alter DNA in different ways, they both lead to double strand breaks (DSB). The DSBs are suspected to be the major cause of cell death repaired by homologous recombination (HR). Earlier studies revealed that HR is essential to bacteria to survive BLM and MMC toxicity. Pioneer works and recent textbooks tend to attribute a particular DNA damage response (DDR) to each type of lesions.

The RecN protein, induced by the SOS regulon, appeared to play important roles in the processing and repair of DNA lesions generated by MMC and BLM. However, the function of RecN in these two repair processes is not yet understood.

RecN is a structural maintenance chromosome (SMC)-like protein that binds on single strand DNA where it can catch a second DNA molecule. *In vitro*, RecN stimulates the ligation of DNA molecules. *In vivo*, RecN prevents sister chromatid segregation and promotes an extreme nucleoid compaction. RecN overexpression is toxic for the cell and its level is regulated by ClpXP proteasome. Because RecN interacts with RecA and both are equally required to survive I-SCE 1 mediated DSB, they are generally associated in the same epistatic group. However, recent data suggest that RecA and RecN may also function in genetically distinct pathways, important for the DNA repair.

In the present study, we took advantage of RecN involvement in the repair of two different types of DNA lesions to investigate the GSR. We demonstrated that sister chromatid dynamics and nucleoid management by RecN differ according to the drug considered. In presence of MMC-induced lesions, RecN requires a pre-processing of the lesions by the nucleotid excision repair (NER) and its activity on sister chromatids occurs early in the repair process. By contrast, in presence of BLM-induced lesions, RecN activity does not require NER processing and occurs later in the recovery phase. Transposition insertion (TIS) analysis revealed that *recN* is one of the rare DDR genes involved in the GSR of both drugs. A lack of RecN significantly disturbed the GSR, by increasing notably the pressure on the base excision repair (BER) pathway, while reducing concomitantly the importance of homologous recombination. The TIS analysis also highlighted how important drug tolerance pathways such as: efflux systems, oxidative stress management and cell cycle controllers, are for successful recovery from DNA alterations. Moreover, RecN activity influences the balance between different solutions. More generally, this work illustrates that GSR is an integrated process that cells adopt to create the most appropriate conditions for their survival.

KEYWORDS

***Escherichia coli*, RecN, Homologous recombination, sister chromatids cohesion, Bleomycin, Mitomycin-C, Nucleotide excision repair**