



HAL
open science

Vers la compréhension des mécanismes de réparation de l'ADN chez *Streptomyces* : identification d'acteurs de la recombinaison

Lingli Zhang

► **To cite this version:**

Lingli Zhang. Vers la compréhension des mécanismes de réparation de l'ADN chez *Streptomyces* : identification d'acteurs de la recombinaison. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0104 . tel-01750832

HAL Id: tel-01750832

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750832>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Ecole doctorale RP2E (Ressources, Procédés, Produits et Environnement)

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

en Ecotoxicité, Biodiversité, Ecosystèmes

et soutenu publiquement le 23 septembre 2014

par

Lingli ZHANG

Vers la compréhension des mécanismes de réparation de l'ADN chez *Streptomyces* : Identification d'acteurs de la recombinaison

Membres du jury:

Rapporteurs:	M. Philippe Mazodier	Directeur de Recherche Institut Pasteur, Paris
	M. Fabrice Confalonieri	Professeur, Université Paris-Sud 11
Examineurs:	Mme. Bénédicte Michel	Directrice de Recherche CNRS, Paris
	M. François Lecointe	Chargé de Recherche INRA, Jouy-en-Josas
Directeur de thèse:	M. Pierre Leblond	Professeur, Université de Lorraine
Co-encadrant de thèse:	Mme. Annabelle Thibessard	Maître de Conférence, Université de Lorraine

Remerciements

Je tiens à remercier d'abord sincèrement Monsieur le Professeur Pierre Leblond, mon directeur de thèse, pour m'avoir fait confiance et accueillie dans son laboratoire, et pour m'avoir guidée et accordé son soutien tout au long de ma thèse. Merci pour la qualité de son encadrement et la pertinence de ses remarques.

J'adresse également toute ma reconnaissance à Madame le Docteur Annabelle Thibessard qui a plus que participé à mon encadrement et à ma formation. Je la remercie pour la qualité de son encadrement, sa grande disponibilité, également son soutien de tous les instants.

Je remercie aussi à Messieurs les Professeurs Philippe Mazodier et Fabrice Confalonieri pour me faire l'honneur d'être rapporteurs de ce travail de thèse.

Merci également à Madame le Professeur Bénédicte Michel et Monsieur le Docteur François Lecointe pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie vivement Claire Bertrand pour le soutien scientifique, Emilie Piotrowski pour son aide à la réalisation technique de ce travail et Ludovic Chipot pour son soutien technique dans le début de thèse.

Merci à tous les membres du laboratoire, passés et présents, que j'ai pu côtoyer. Difficile de citer tout le monde, alors merci à tous pour vos soutiens et amitiés. J'ai été vraiment ravie de pouvoir travailler dans une ambiance aussi bonne.

Je remercie ma famille, Papa, Maman et mes beaux parents pour leur soutien. Et enfin un grand merci à Zhenghui, mon mari pour son soutien de tous les jours et également à Ellie, ma chérie, de m'avoir accompagnée pendant les moments difficiles. Cette thèse n'aurait pas eu la même saveur sans vous.

Liste des abréviations

A-EJ	Alternative end-joining
AEP	Archaeo eukaryotic primase
AID	Activation-induced cytidine deaminase
BER	Base excision repair
BIR	Break-induced replication
BLM	Bloom syndrom
cSDR	Constitutive-stable DNA replication
DSB	Double strand break
DSBR	Double strand break repair
ECF	Extracytoplasmic sigma factor
eGFP	Enhanced green fluorescent protein
EMS	Ethyle méthanesulfonate
GOC	Gene order conservation
IF	Initiation factor
iSDR	Induced-stable DNA replication
MGMT	6-O-methylguanine DNA methyltransferase
MLSA	Multilocus sequence analysis
MMC	Mitomycine C
MMR	DNA mismatch repair
MRN	Mre11/Rad50/Nbs1 complexe
MRX	Mre11/Rad50/Xrs2 complexe
NER	Nucleotide excision repair
NHEJ	Non-homologous end joining
RDR	Recombination-dependent replication
RFR	Replication fork reversal
RH	Recombinaison homologue
RI	Recombinaison illégitime
ROS	Reactive oxygen species
RPA	Replication protein A
RSS	Recombination signal sequence
SAP	SAF-A/B, Acinus and PIAS
SD	Shine-Dalgarno
SDSA	Synthesis-dependent strand annealing
SF1	Superfamille 1
SSA	Single-strand annealing
SSB	Single-stranded DNA-binding protein
TIR	Terminal inverted repeat

Sommaire

Remerciements.....	1
Liste des abréviations.....	2
Sommaire.....	3
1. Introduction.....	6
6.1. Réplication conservative, mutations et évolution.....	6
6.2. Sources des mutations.....	8
1.2.1. Les erreurs de réplication.....	8
1.2.2. Les lésions spontanées de l'ADN.....	9
1.2.3. Les lésions induites par les agents mutagènes.....	10
1.2.4. Mécanismes de réparation d'ADN.....	10
1.2.5. Le système SOS.....	14
1.2.6. Le transfert horizontal.....	15
6.3. Mécanismes de réparation des cassures double-brin.....	20
1.3.1. Origine des cassures double-brin de l'ADN.....	20
1.3.2. Multiplicité des mécanismes de réparation des DSB.....	21
6.4. Pourquoi <i>Streptomyces</i> comme modèle d'étude de la réparation des DSB ?.....	47
1.4.1. Une organisation chromosomique originale.....	48
1.4.2. L'instabilité génétique chez <i>Streptomyces</i>	49
1.4.3. Région de synténie dégénérée.....	51
1.4.4. Les recombinaisons chez <i>Streptomyces</i>	52
2. Objectifs de la thèse.....	54
3. Résultats.....	56
3.1. La recombinaison homologue.....	56
3.1.1. Les gènes <i>adnAB</i> dans les génomes de <i>Streptomyces</i>	56
3.1.2. <i>adnAB</i> est essentiel chez les <i>Streptomyces</i>	61
3.1.3. <i>adnA</i> et <i>adnB</i> de <i>Streptomyces</i> sont inductibles par les dommages à l'ADN.....	68
3.1.4. <i>adnAB</i> de <i>S. ambofaciens</i> complète la souche d' <i>E. coli</i> Δ <i>recB</i>	71
3.1.5. L'ajout d'une seconde copie d' <i>adnAB</i> affecte le phénotype de <i>Streptomyces</i>	75
3.2. La recombinaison illégitime.....	82
3.2.1. Identification <i>in silico</i> d'acteurs potentiel du NHEJ de <i>Streptomyces</i>	82
3.2.2. Caractérisation d'acteurs potentiels du NHEJ de <i>S. ambofaciens</i>	86
4. Discussion.....	103
4.1. L'hélicase-nucléase AdnAB, la recombinaison homologue et la survie chez les <i>Streptomyces</i>	103
4.1.1. L'hélicase-nucléase AdnAB est essentielle chez les <i>Streptomyces</i>	103
4.1.2. Le locus <i>adnAB</i> est impliqué dans la réparation de l'ADN.....	112
4.1.3. La réponse SOS est-elle indépendante de LexA chez les <i>Streptomyces</i> ?.....	113
4.2. Identification d'acteurs d'un mécanisme de recombinaison illégitime chez <i>S. ambofaciens</i> : implication dans la réparation des DSB.....	117

4.2.1.	KuA et KuC sont impliquées dans la résistance aux stress génotoxiques	117
4.2.2.	Les protéines Ku jouent-elles un rôle dans la protection des télomères chez les <i>Streptomyces</i> ?.....	120
4.2.3.	Caractérisation des homologues LigD.....	121
4.3.	Compétition entre RH et NHEJ chez <i>Streptomyces</i>	123
4.3.1.	RH et NHEJ : entre collaboration et compétition chez les eucaryotes.....	123
4.3.2.	Et chez les bactéries ?	125
4.4.	Recombinaison et évolution du génome des <i>Streptomyces</i>	127
5.	Perspectives.....	130
6.	Matériel et Méthodes.....	132
6.1.	Souches bactériennes, plasmides et BAC	132
6.1.1.	Souches bactériennes	132
6.1.2.	Plasmides	132
6.1.3.	BAC (Bacterial Artificial Chromosome).....	135
6.1.4.	Cosmides	136
6.2.	Condition de cultures.....	136
6.3.	Construction des plasmides, cosmide et BAC recombinants.....	137
6.5.1.	Les constructions pour la mutagenèse	137
6.5.2.	Les plasmides recombinants pour les expériences de complémentation	140
6.5.3.	Les plasmides recombinants utilisés pour la localisation des homologues de Ku	141
6.4.	Extraction d'ADN et d'ARN	143
6.5.	Transformation des souches d'E. coli et de <i>Streptomyces</i>	143
6.8.1.	Transformation des souches d'E. coli.....	143
6.8.2.	Conjugaison inter-générique.....	143
6.6.	Tests de PCR quantitative et PCR semi-quantitative	144
6.7.	Tests d'activité nucléase	144
6.8.	Caractérisation phénotypique	145
6.8.1.	Test de viabilité cellulaire.....	145
6.8.2.	Exposition aux rayonnements UV.....	145
6.8.3.	Traitement à la mitomycine C.....	145
6.8.4.	Exposition aux rayonnements gamma.....	146
6.8.5.	Exposition au flux d'électrons	146
6.9.	Observation au microscope à épifluorescence des souches de <i>Streptomyces</i>	146
7.	Références	152

INTRODUCTION

1. Introduction

6.1. Réplication conservative, mutations et évolution

Une des vocations majeures de l'ADN est de se reproduire, cette fonction est appelée réplication. La réplication permet la transmission fidèle de l'information génétique de génération en génération. Elle est, de par son mécanisme semi-conservatif, le principal mécanisme de conservation de l'information génétique.

Néanmoins, la diversité des organismes vivants qui nous entourent et de leurs caractéristiques morphologiques est remarquable, tout comme le sont leurs capacités d'adaptation à leur environnement. Charles Robert Darwin (1809-1882) a révolutionné les fondements de la biologie en publiant en 1859 son ouvrage 'De l'origine des espèces', et en fondant la théorie de l'évolution des organismes. De l'observation de la variabilité des organismes vivants est née sa théorie évolutionniste. Ainsi des variations interindividuelles sont observées chez les espèces soumises à l'environnement naturel ou dans des conditions de domestications. Les organismes vivants présentent donc la capacité spontanée de varier. De plus, certaines de ces variations peuvent être fixées héréditairement, c'est-à-dire transmise à la descendance par la reproduction sexuée. A la fin du 19^{ème} siècle, William Bateson (1861-1926) prend en compte l'existence de variations brusques, discontinues et héréditaires chez les organismes. Il est à l'origine du terme de génétique pour désigner la nouvelle science de l'hérédité.

Par conséquent, l'évolution de l'information génétique résulte d'une balance subtile entre conservation et variation génétique.

En 1901, Hugo de Vries (1848-1935) a publié un ouvrage intitulé « Die Mutationstheorie ». Dans ce volume il nomme mutation les variations brusques et héréditaires qui seraient selon lui à l'origine de la diversification des espèces. Le mutationnisme voit le jour. Selon cette théorie, les mutations peuvent expliquer à elles seules l'apparition de nouvelles espèces. Sur ce point elle s'affronte avec la théorie de Darwin qui donne à la sélection naturelle un rôle clé dans le processus de diversification des espèces. Avec les progrès de la génétique des populations dans les années 1930, mutations et sélection naturelle trouvent leur place dans la théorie synthétique de l'évolution, exposée par George Gaylord Simpson en 1944 dans « Rythme et modalités de l'évolution ». Il est maintenant incontestablement établi que les mutations sont la source de la variabilité génétique, et que dans certaines conditions, la sélection naturelle « fait le tri » parmi les mutations mais n'est pas génératrice de variabilité. Ce principe s'appliquant aussi aux bactéries a été plus clairement démontré dans des modèles bactériens par Luria et Delbrück (1943), Newcombe (1949) et Lederberg and Lederberg (1952).

6.2. Sources des mutations

La mutation est un changement de l'information génétique. Au niveau moléculaire, les mutations peuvent être classées en trois catégories : (1) les mutations ponctuelles ou géniques affectant un ou plusieurs nucléotides (remplacement d'un ou plusieurs nucléotides, insertion et délétion); (2) des réarrangements chromosomiques modifiant l'organisation du génome (délétion, translocation, inversion, duplication, fusion et fission chromosomique); (3) les mutations d'insertion due à l'intégration d'ADN étranger par transfert horizontal.

Les mutations sont principalement introduites par les deux mécanismes clés de maintenance de l'ADN et de l'information génétique : la réplication de l'ADN et l'ensemble des mécanismes de réparation.

1.2.1. Les erreurs de réplication

La réplication est un mécanisme hautement fidèle qui repose sur la synthèse du brin d'ADN fils par copiage du brin parental; le mécanisme est appelé hémisynthèse (Meselson et Stahl, 1958). Ce mécanisme engendre peu d'erreurs grâce à deux niveaux de contrôle : l'un, dit « pré-synthétique », est capable de sélectionner le bon nucléotide à incorporer à chaque position, le second, dit « post-synthétique », permet une correction par délétion du nucléotide inadéquat immédiatement après son incorporation grâce à l'activité 3'-5' exonucléolytique (activité 'proof reading') de la sous-unité de ϵ de l'ADN polymérase III qui est responsable de l'activité de relecture. Donc, le taux d'erreur est compris selon les isolats d'*E. coli* entre 10^{-8} et 10^{-10} erreur par paire de bases. La déficience de cette activité conduit à une augmentation d'un facteur 100 des erreurs d'incorporation, et confère donc un phénotype hypermutateur (Degnen et Cox, 1974; Michaels *et al.*, 1990).

1.2.2. Les lésions spontanées de l'ADN

Des altérations de la structure chimique des bases de l'ADN peuvent se produire spontanément. Sont en cause les propriétés intrinsèques de l'ADN. Les dommages plus classiques sont la désamination et la dépurination/dépyrimidination. Le premier phénomène correspond à la perte du groupement amine (position 4), et transforme la cytosine en uracile, base normalement absente dans l'ADN. Des mécanismes d'excision de spécificité diverse permettent le remplacement correct de cette base modifiée. La dépurination/dépyrimidination correspond à la perte du plateau d'une base. Ces deux lésions, présence d'un site abasique ou d'une base anormale de l'ADN, n'affectent pas le squelette de sucre et de phosphate de l'ADN, mais sont néanmoins pré-mutagènes, et peuvent entraîner une erreur de réplication si aucune réparation n'a lieu.

Les fréquences de ces lésions spontanées sont faibles mais leur accumulation convainc de l'utilité des mécanismes de prises en charge. En effet, il y a environ 100-500 déaminations spontanées par jour et par cellule dans le génome d'humain, qui s'ajoutent aux 9000-10000 dépurinations spontanées (Lindahl et Nyberg, 1972). Cela en fait la première cause endogène d'altération de l'ADN. Certains nucléotides ou contextes nucléotidiques sont plus propices à ces dommages : ainsi, les cytosines méthylées en position 5 (5mC) constituent des points chauds de transition. En effet, par désamination spontanée les 5mC se transforment en thymine. Pour cause, il n'existe pas de mécanisme d'élimination des thymines puisqu'il s'agit d'une base normalement présente dans l'ADN, contrairement à l'uracile. Ainsi, des mutations ponctuelles (cytosine vers thymine) vont se produire à hautes fréquences aux positions des 5mC.

1.2.3. Les lésions induites par les agents mutagènes

Des lésions d'ADN sont induites par des agents mutagènes qui peuvent être classés en deux catégories : (1) les agents chimiques tels que les agents alkylants, les agents intercalants, les analogues des bases et (2) les agents physiques comme des radiations ionisantes, des rayonnements UV. Certains agents induisent des modifications de l'ADN comme les agents alkylants qui modifient une base de l'ADN en lui transférant un groupe méthyle ou éthyle. Les radiations ionisantes induisent plus de 70 types de lésions oxydatives différentes dont des cassures simple et double brin. Les rayons UV provoquent la formation de dimères de bases adjacentes (notamment des thymines). Certains agents perturbent la structure de la double hélice comme les agents intercalants qui agissent en modifiant l'espacement entre les paires de bases. Par ailleurs, les analogues des bases peuvent leurrer la machinerie répliquative en se substituant aux bases de l'ADN lors de la réplication et induire des mutations aux cycles réplicatifs ultérieurs.

1.2.4. Mécanismes de réparation d'ADN

Les lésions en quantités trop importantes vont entraîner la mort cellulaire, et ne présentent aucune conséquence évolutive. En revanche, lorsque ces dommages vont être endigués, la nature du mécanisme de prise en charge va déterminer le caractère correct ou incorrect de la réparation, et donc ses conséquences sur le maintien de l'intégrité de l'information génétique.

Les paragraphes suivants présenteront les mécanismes principaux de réparation de l'ADN et leurs contributions à la production des mutations.

1.2.4.1. Réparation par excision

- Réparation par excision de base

Suite à l'action de mutagènes ou spontanément, des bases aberrantes peuvent être présentes dans l'ADN. Par exemple, l'uracile peut apparaître suite à une désamination d'une 5mC. Des bases modifiées sont produites par oxydation ou alkylation. La réparation par excision de base (BER) est communément utilisée pour éliminer par excision les bases endommagées. Dans ce processus, une ADN glycosylase reconnaît la base modifiée et l'élimine, puis une activité endonucléasique clive le désoxyribose. Une ADN polymérase remplit à nouveau l'espace libéré en utilisant la base complémentaire comme matrice. Enfin, une ADN ligase suture le brin réparé. Les mutations dans les acteurs de la réparation par BER entraînent une augmentation de la fréquence de mutations chez de nombreux organismes (Reagan *et al.*, 1995; Denver *et al.*, 2006; Kurthkoti *et al.*, 2008) (figure 1).

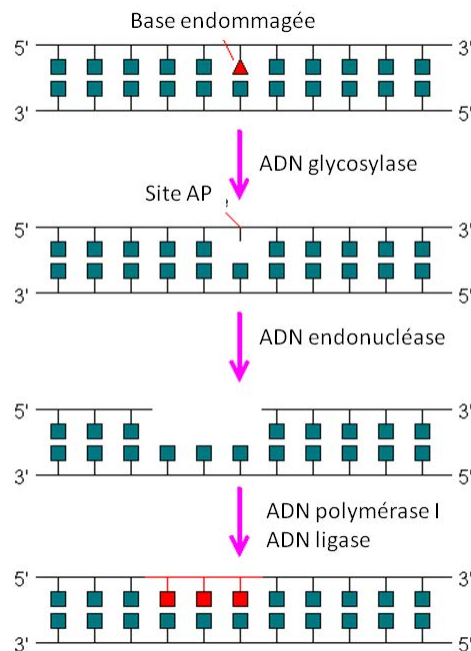


Figure 1. Modèle de la réparation de l'ADN par excision de base (BER) chez *E. coli*

- Réparation par excision de nucléotides

La réparation par excision du nucléotide (NER) est un mécanisme plus flexible que le BER. Elle permet la réparation par excision d'un segment d'ADN contenant le site endommagé. Le principe est la reconnaissance de la perturbation engendrée par le dommage quelle que soit sa nature puis une endonucléase clive de part et d'autre de la lésion. Le segment d'ADN contenant la lésion est éliminé grâce à une activité hélicase. L'ADN polymérase synthétise un nouveau brin à partir de l'extrémité 3'OH libre puis l'ADN ligase lie le segment nouvellement synthétisé au brin d'ADN (figure 2). Chez *E. coli*, le NER est catalysé par l'excinucléase UvrABC et une hélicase UvrD. L'inactivation d'*uvrD* augmente la fréquence de mutations spontanées par un facteur 100 (Washburn et Kushner, 1991; Hall, 1995; LeCuyer *et al.*, 2010).

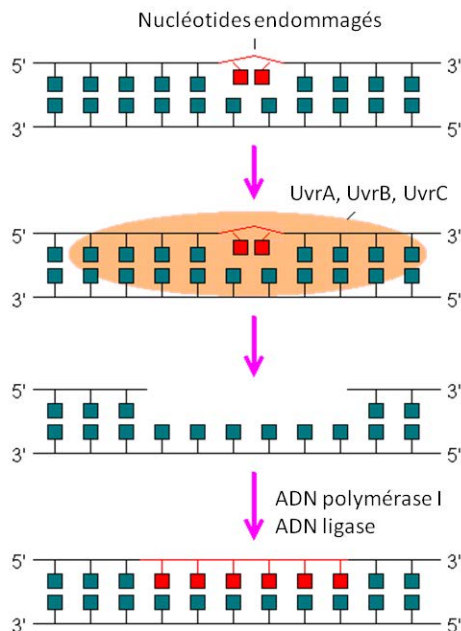


Figure 2. Modèle de la réparation de l'ADN par excision de nucléotides (NER) chez *E. coli*

- Réparation des mésappariements

Un troisième système de réparation par excision reconnaît les bases qui, bien que mésincorporées et donc incorrectes, ont été maintenues dans le brin d'ADN. Un mécanisme spécifique, post-répliatif, appelé 'DNA mismatch repair' ou MMR permet l'élimination efficace de ces erreurs. Lorsqu'un mésappariement dans le brin néosynthétisé est formé, le système MMR l'excise et restaure la séquence originelle (figure 3). La discrimination des brins, parental et néosynthétisé, se fait grâce au caractère méthylé du brin parental. La méthylation est un phénomène post-répliatif. Chez *E. coli*, les protéines MutS, MutL et MutH sont les acteurs

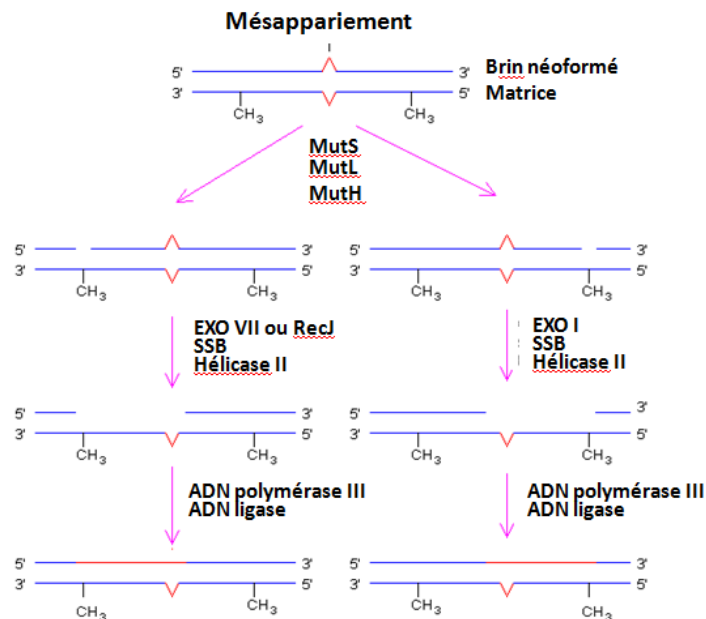


Figure 3. Modèle de la réparation des mésappariements (MMR) chez *E. coli*

Le processus de réparation par MMR commence par la reconnaissance des mésappariements par la protéine MutS. Ensuite, MutL est recruté pour former le complexe MutSLH avec MutH déjà fixé sur le site GATC. Sous cette forme complexée, MutH est activé et clive le brin non méthylé au niveau du site GATC. Puis, une exonucléase intervient au site de clivage avec l'aide d'hélicase II et des protéines SSB. Si le clivage se produit sur le côté 3' du mésappariement, cette étape est réalisée par l'exonucléase I. Si le clivage se produit sur le côté 5' du mésappariement, cette étape est réalisée par l'exonucléase VII ou RecJ. La lacune est comblée par l'ADN polymérase III et l'ADN ligase.

essentiels pour ce mécanisme MMR. Ainsi, des mutations dans ces gènes sont à l'origine d'une mutabilité spontanée se traduisant principalement par des transitions et des délétions d'un seul nucléotide ainsi que quelques transversions (Modrich, 1991).

Par ailleurs, le MMR joue un rôle anti-recombinogène, servant de barrière à la recombinaison entre les séquences peu homologues. Chez les bactéries, cela empêche l'intégration au chromosome de séquences trop divergentes et chez l'homme, c'est la recombinaison non allélique qui est limitée (Rayssiguier *et al.*, 1989; Selva *et al.*, 1995; de Wind *et al.*, 1995; Chambers *et al.*, 1996; Štambuk et Radman, 1998).

1.2.4.2. Réparation par recombinaison

En cas de cassures de l'ADN ou si les deux brins de la molécule sont altérés, la réparation par recombinaison est utilisée. Deux grands types de mécanismes sont à distinguer : (i) ceux faisant intervenir la recombinaison homologue (RH) qui permet une réparation la plupart du temps fidèle et (ii) ceux appelés collectivement recombinaison illégitime (RI) susceptibles d'engendrer des mutations. La recombinaison homologue nécessite la présence de séquences homologues et d'une protéine synaptique, capable de promouvoir l'échange de brin d'ADN au sein du duplex d'ADN. Les mécanismes de recombinaison illégitime bien que faisant intervenir des acteurs très divers ont tous en commun de s'affranchir de la présence de séquences homologues pour recombiner des molécules d'ADN.

1.2.5. **Le système SOS**

Chez les bactéries, les cellules exposées à des agents endommageant l'ADN expriment une réponse appelée réponse SOS. Il s'agit d'un ensemble de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN. Cette

réponse est inductible et proportionnée à l'agression. Elle doit permettre de parer à l'accumulation des dommages par l'expression accrue de mécanismes de réparation correcte (error-free) ou l'induction d'une composante incorrecte (error-prone). Cette réponse repose sur un contrôle transcriptionnel en *trans* d'un ensemble de gènes dispersés dans le génome. Chez *E. coli* et de nombreuses autres bactéries, le couple LexA-RecA est l'acteur central de la réponse SOS. La fixation de la protéine LexA sur le promoteur des gènes cibles assure la répression de leur expression. Un dommage à l'ADN génère un signal (présence d'ADN simple brin) qui active l'activité co-protéasique de la protéine RecA (appelée RecA*). Cette activité, en favorisant la dégradation de LexA, dérègle le régulon SOS. Outre la surexpression des systèmes de réparation correcte (tel le système d'excision Uvr), une composante mutagène codée par l'opéron *umcDC* exprimant une polymérase infidèle appelée polymérase V. Cette polymérase possède une activité translesion qui lui permet de synthétiser le brin complémentaire à travers un dommage porté par l'ADN matrice. En contrepartie, la synthèse est le plus fréquemment incorrecte par rapport à l'information originelle (Goodman, 2002). Une autre polymérase infidèle est induite lors de la réponse SOS, il s'agit de DinB, aussi appelé polymérase IV. Cette polymérase a une activité translesion plus faible que la PolV, et induit des mutations sur des matrices non endommagées. DinB participe également à la mutagenèse adaptative (McKenzie *et al.*, 2001) dépendant du régulateur clé de la phase stationnaire RpoS, et de la recombinaison homologue (Galhardo *et al.*, 2009).

1.2.6. Le transfert horizontal

Le transfert horizontal correspond à l'acquisition de matériel génétique à partir d'un donneur non ascendant (Goldenfeld and Woese, 2007). Ce donneur peut être apparenté ou phylogénétiquement distant, jusqu'à appartenir à un règne vivant distinct. Chez les bactéries, le transfert horizontal joue un rôle prépondérant dans

leur diversification et constitue un mécanisme d'évolution rapide. En effet, ce phénomène permet l'acquisition de gènes 'prêts-à-l'emploi' en un seul événement à comparer aux mécanismes évolutifs nécessitant l'accumulation de mutations ponctuelles. La divergence, précédée ou pas de la duplication du gène ancestral, requiert en effet la formation de mutations ponctuelles indépendantes qui, sélectionnées, aboutissent à l'expression d'une nouvelle fonction. Cet événement est extrêmement rare chez les bactéries comparé à la fréquence des transferts horizontaux.

L'ADN exogène peut être internalisé par trois mécanismes différents avant d'être recombiné au génome de la bactérie hôte : la transformation naturelle, la transduction et la conjugaison (figure 4).

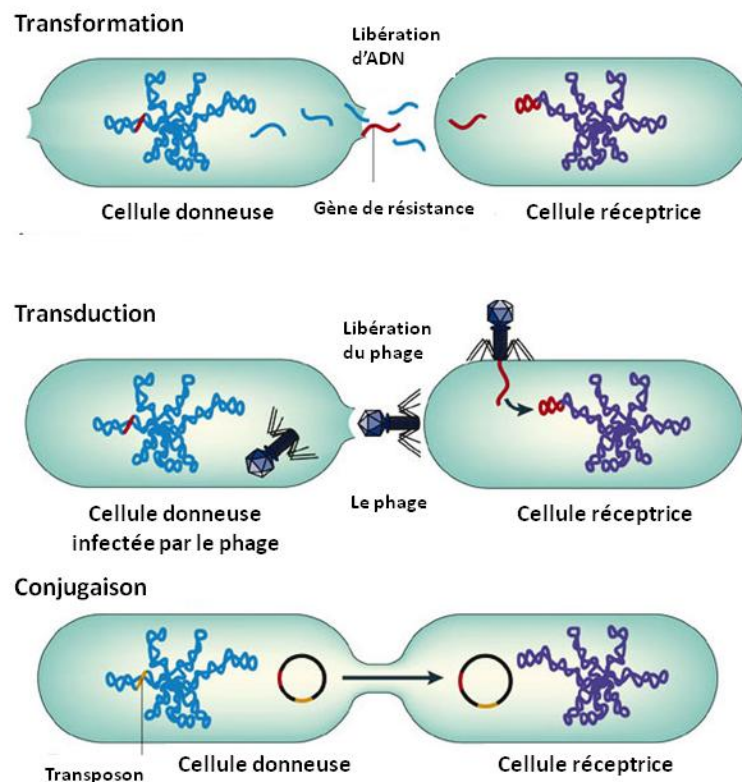


Figure 4. Modèles du transfert horizontal de gène entre les bactéries.

1.2.6.1. La transformation

La transformation requiert le développement d'un état physiologique particulier, génétiquement contrôlé : la compétence. Il s'agit d'exprimer un ensemble de gènes permettant l'expression d'un système de captation de l'ADN présent dans le microenvironnement cellulaire et de le recombiner au génome de l'hôte. Ce phénomène a été très étudié chez une bactérie Gram-positif pathogène de l'homme, *Streptococcus pneumoniae* (Griffith, 1928; Avery *et al.*, 1944; Claverys et Håvarstein, 2007). Il a été montré récemment que ce mécanisme faisait partie intégrante d'une réponse cellulaire de stress appelée état X. Cette réponse inclut notamment l'expression de toxines et de facteurs de lyse cellulaire efficaces sur des individus de la même espèce mais n'exprimant pas les mêmes signaux cellulaires. Ainsi, cet état X et la compétence sont-elles décrits comme un comportement fratricide, où la lyse d'une fraction de la population de *S. pneumoniae* bénéficiera de la mort cellulaire d'une autre fraction, en captant notamment l'information génétique des cellules lysées pour diversifier son génome.

1.2.6.2. La transduction

La transduction est l'apanage des bactériophages qui en lysant les bactéries hôtes peuvent accidentellement empaqueter des segments d'ADN génomique dans les virions en formation et générer des particules transductrices. Lorsque ces virions transducteurs infectent des bactéries au cycle suivant, un fragment d'ADN exogène peut être recombiné au génome de l'hôte et donner un recombinant. On distingue généralement deux transductions : l'une dite généralisée est le résultat de bactériophages lytiques, l'autre dite spécialisée implique des bactériophages lysogènes, capable de s'intégrer au génome hôte sous une forme dormante (prophage). L'excision du virus au moment de l'initiation d'un cycle lytique génère alors des particules transductrices contenant un génome phagique partiel associé

aux séquences adjacentes du site d'insertion. Les séquences et gènes transférés sont donc toujours localisés dans la même région génomique de l'hôte d'où le terme de 'transduction spécialisée'. Récemment, l'implication de ce phénomène sur la création de la diversité génétique de *S. pneumoniae* au cours d'une infection chronique chez l'enfant dans le développement du caractère pathogène a pu être démontrée (Hiller *et al.*, 2010).

1.2.6.3. La conjugaison

La conjugaison bactérienne est le seul phénomène qui nécessite un contact physique entre la donneuse et la receveuse. Un élément génétique possédant les fonctions de conjugaison est nécessaire pour l'établissement du contact entre les partenaires et le transfert du matériel génétique. Le paradigme de la conjugaison bactérienne a été développé chez *E. coli* avec le facteur de fertilité F, qui peut être plasmidique ou intégré au chromosome (Wollman *et al.*, 1956). Les fonctions portées par F confèrent à la bactérie hôte la capacité de synthèse du pilus dit sexuel, par l'intermédiaire duquel la bactérie porteuse (donneuse) peut transférer une copie du plasmide F et des séquences associées en *cis* vers la bactérie receveuse.

Bien que le transfert soit fréquent dans tous les écosystèmes, la séquence transférée doit tout d'abord être maintenue à court terme pour avoir un impact évolutif. Ainsi, l'exogénote peut présenter des capacités répliquatives et se propager de façon autonome, ou s'intégrer au génome hôte via un mécanisme de recombinaison homologue, illégitime ou site-spécifique, et ainsi être transmis comme un marqueur chromosomique. Bien que maintenu à court terme, c'est à l'échelle des temps évolutifs que le succès d'une séquence ou d'un gène se mesure. Ainsi, c'est la pression sélective exercée par l'environnement qui définit si une séquence sera conservée au sein d'un génome. La taille des génomes bactériens étant considérée comme contrainte, le maintien d'une séquence dans un génome est considéré

comme reflétant l'avantage adaptatif qu'elle confère. Si une séquence est délétère ou neutre, elle aura tendance à être contre-sélectionnée ; si elle est favorable, elle aura tendance à être conservée aux dépens d'autres moins avantageuses.

6.3. Mécanismes de réparation des cassures double-brin

La partie qui suit va s'intéresser aux mécanismes de réparation des cassures double-brin, notamment la recombinaison homologue et la recombinaison illégitime par NHEJ (pour Non-Homologous End Joining).

1.3.1. Origine des cassures double-brin de l'ADN

La cassure double-brin (DSB pour double-strand break) est une forme de dommage très délétère dont les origines sont diverses. Les DSB peuvent être induites par des produits exogènes de nature physique tels que les radiations ionisantes et ultraviolettes (UV) ou de nature chimique comme les agents radiomimétiques (e.g. la bléomycine), les inhibiteurs de topoisomérase et les agents alkylants (e.g. la mitomycine C (MMC)).

L'origine de DSB peut également être endogène et être contrôlée ou non par la cellule. Une étude a montré que le nombre de DSB formée lors d'un cycle cellulaire avoisine 50, soit une cassure toutes les 1.10^8 paires de bases chez l'homme (Vilenchik and Knudson, 2003). Le métabolisme cellulaire est une des sources endogènes les plus importantes de DSB (i.e. ROS pour Reactive Oxygen Species). Une autre source importante de génération de DSB est la réplication. La rencontre de la machinerie de réplication avec une lésion simple brin provoque l'arrêt de la fourche de réplication, et se traduit par une cassure d'une chromatide sœur (Kogoma, 1997).

Par ailleurs, les DSB peuvent être induites, de façon programmée, par des mécanismes : (i) dans la recombinaison V(D)J, les protéines RAG1 RAG2, en tant que recombinases, s'associent entre elles pour reconnaître les séquences RSS (pour Recombination Signal Sequence) et induire le clivage de l'ADN aux sites RSS (van Gent *et al.*, 1996). Ce mécanisme produit un répertoire énorme de protéines de

liaison à l'antigène, récepteurs des cellules T et immunoglobulines au cours du développement des cellules lymphoïdes et donc est un exemple remarquable d'un réarrangement d'ADN programmé dans le but de générer de la diversité ; (ii) dans la commutation isotypique, un processus permettant de changer les classes d'immunoglobulines produites lors de la maturation de lymphocyte B, la protéine AID (pour activation-induced cytidine deaminase) est impliquée dans la formation de DSB et (iii) pendant la méiose, une endonucléase Spo11 peut catalyser la formation de DSB qui engage efficacement la recombinaison homologue entre les chromatides des homologues maternels et paternels dans les cellules germinales et ainsi induit une grande variabilité (Sun *et al.*, 1989; Keeney, 2001).

1.3.2. Multiplicité des mécanismes de réparation des DSB

Les DSB peuvent être prises en charge, de façon plus ou moins fidèle, par différentes machineries cellulaires permettant d'assurer l'intégrité chromosomique : il s'agit de restaurer la structure chromosomique afin d'en assurer la réplication et la ségrégation dans les cellules filles.

Chez les eucaryotes, la recombinaison homologue et la recombinaison illégitime prennent en charge les DSB (Pfeiffer *et al.*, 2000) (figure 5).

La réparation impliquant la recombinaison homologue résulte du copiage d'une matrice intacte afin de combler la lacune générée par la DSB sur le duplex endommagé. Dans le système DSBR (pour Double-Strand Break Repair), les extrémités de DSB sont d'abord modifiées ou maturées pour générer une extrémité simple brin 3' sortante qui va ensuite pouvoir envahir le chromosome homologue (méiose) ou la chromatide sœur (mitose). Le brin envahissant sert de matrice dans une étape de synthèse d'ADN semi-conservative. L'ADN néosynthétisé est donc présent dans chacun des brins donneur et receveur. En fonction de la polarité des

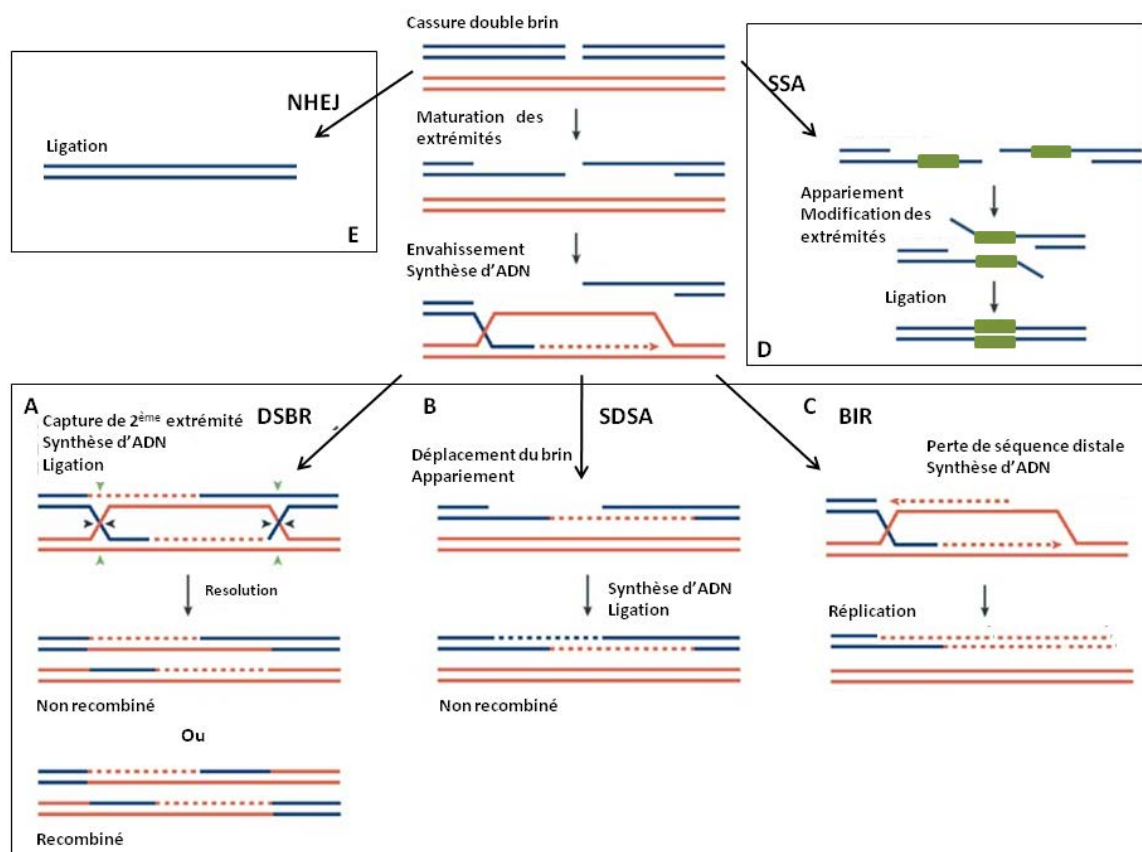


Figure 5. Représentation schématique de la multiplicité des mécanismes de réparation des DSB.

Les DSB, une fois formés, peuvent être pris en charge par les voies de la recombinaison homologe telles que DSBR (A), SDSA (B), BIR (C) et SSA (D) ou de la recombinaison illégitime comme le NHEJ (E).

coups lors de la résolution des croix de Holliday, cette réparation peut engendrer ou non un crossing-over (figure 5 A). La caractéristique principale du modèle SDSA (pour Synthesis-Dependent Strand Annealing) est qu'après la modification des extrémités de DSB et l'envahissement du chromosome homologue ou la chromatide sœur par l'extrémité 3' sortante, le brin d'ADN néoformé, est déplacé de la matrice, se reassocie et est relié avec l'autre extrémité de la molécule cassée. Cette voie engendre donc des brins non recombinés (figure 5 B). Dans le modèle BIR (pour Break-Induced Replication), l'extrémité 3' sortante envahit les séquences homologues ou la chromatide sœur et initie la synthèse des brins précoce et tardif au sein d'une fourche de réplication (figure 5 C). Par ailleurs,

si la DSB est formée entre deux séquences répétées, la réparation pourra être faite par le système SSA (pour Single-Strand Annealing) : l'appariement des séquences répétées du même chromosome, la modification des extrémités de la DSB engendre la suppression d'une copie de la séquence répétée et de la séquence intercalée initialement comprise entre les deux répétitions.

Le mécanisme illégitime est une cause majeure du réarrangement génomique. Il implique des enzymes pour couper et liguer l'ADN ou des enzymes qui répliquent l'ADN (Ehrlich *et al.*, 1993). La réparation de DSB par NHEJ, un système de RI, se réalise par la ligation des extrémités de DSB. Il intervient en absence complète de séquences homologues ou est facilité par la présence de micro-homologies (1-10 pb).

Chez les bactéries, la recombinaison homologue et la recombinaison illégitime ou NHEJ sont également les deux systèmes principaux de prise en charge des DSB.

1.3.2.1. Le mécanisme de recombinaison homologue

Les mécanismes de réparation impliquant la RH sont fidèles dans la majeure partie des cas.

- Les étapes de la RH

La RH comporte trois étapes : l'étape pré-synaptique, l'étape synaptique et l'étape post-synaptique (figure 6). Ces étapes sont réalisées par des complexes enzymatiques qui diffèrent selon les espèces (tableau 1).

a) L'étape pré-synaptique

L'étape pré-synaptique concerne la phase dite de maturation des extrémités des DSB. Au cours de cette phase, les extrémités sont modifiées par une activité hélicase et nucléase afin de former un ADN simple brin 3' sortant (figure 6).

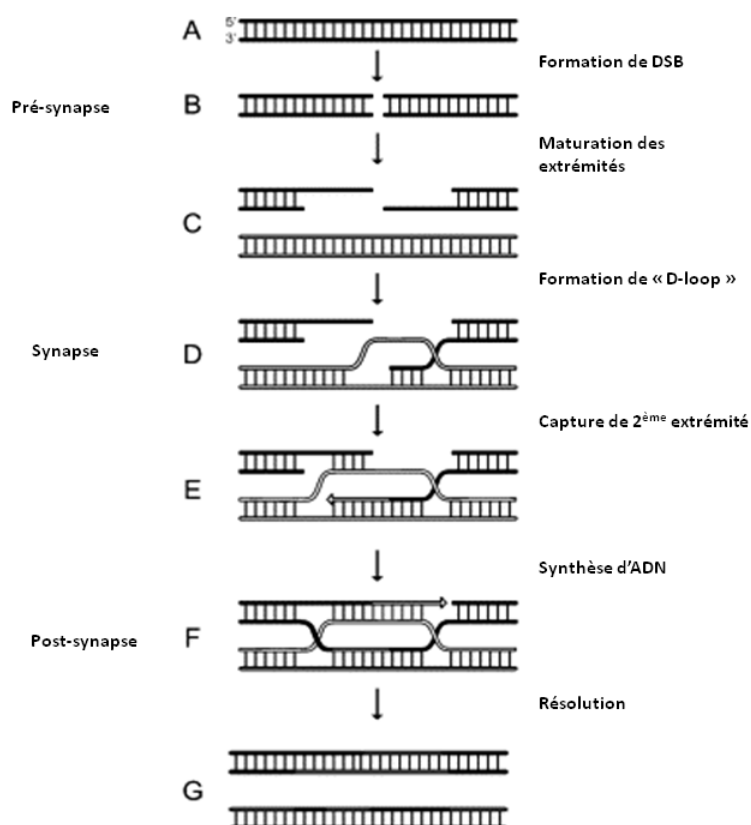


Figure 6. Représentation schématique du mécanisme de la recombinaison homologue. D'après Wyman et al. (2004)

Ce processus est catalysé par un complexe protéique chez les bactéries : RecBCD chez *E. coli*, AddAB chez *Bacillus subtilis* et AdnAB chez *Mycobacterium tuberculosis*. Par contre, chez les eucaryotes, les facteurs impliqués sont plus nombreux. Chez la levure, il s'agit du complexe enzymatique MRX (Mre11-Rad50-Xrs2), d'une hélicase telle que Sgs1, de nucléases telles que Dna2, Exo1 et Sae2. Ces protéines constituent différentes voies de maturation. Leurs homologues chez les eucaryotes supérieurs sont aussi identifiés : le complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1), l'hélicase BLM (pour Bloom syndrom), les nucléases DNA2, EXO1 et CtIP (Maringele et Lydall, 2002;

Clerici *et al.*, 2005; Sartori *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2008; Nimonkar *et al.*, 2011). Le processus de la recombinaison homologue est initié avec l'ADN simple brin chargé de la protéine SSB (pour Single-Stranded binding Protein) chez les bactéries ou de la protéine RPA (pour Replication protein A) chez les eucaryotes. Ensuite, avec l'aide des médiateurs de la recombinaison homologue (tableau 1), la protéine recombinase (RecA chez les bactéries, Rad51 chez les eucaryotes) se fixe sur l'ADN simple brin 3' sortant et forme un filament nucléoprotéique hautement organisé qui est appelé «filament pré-synaptique». Cette protéine recombinase est essentielle pour la recombinaison homologue.

b) L'étape synaptique

Cette étape conduit à l'appariement des séquences homologues et l'échange de brin. Une fois assemblé, le filament pré-synaptique capture une molécule d'ADN double brin pour chercher la séquence homologue en formant le complexe synaptique. Une fois ce complexe formé, le filament nucléoprotéique favorise l'invasion du double-brin d'ADN par l'extrémité 3'OH simple-brin. Le simple-brin envahissant peut s'apparier avec son brin complémentaire et cette structure intermédiaire est appelée «D-loop» (Cox *et al.*, 2005) (figure 6). L'envahissement du brin est catalysé par RecA chez les bactéries, Rad51, Dmc1 et Rad54 chez les eucaryotes (tableau 1).

c) L'étape post-synaptique

L'étape post-synaptique correspond au traitement des jonctions de Holliday, ce qui permet de libérer les deux partenaires de l'échange. En effet, après la formation de la D-loop, à l'aide d'une translocase (RuvAB ou RecG chez les bactéries et Rad54 chez les eucaryotes) (Lloyd et Sharples, 1993a, 1993b; Sanchez *et al.*, 2005; Mazin *et al.*, 2010), l'ADN est synthétisé en utilisant le simple-brin envahissant comme amorce et la séquence complémentaire comme matrice, jusqu'à atteindre la

deuxième extrémité de la cassure (figure 6). A cette étape, deux jonctions de Holliday (structures caractéristiques où deux brins des deux molécules d'ADN impliquées dans la recombinaison se croisent) sont présentes (West, 2003). Cette structure est résolue par des enzymes appelés «résolvases» (RuvC chez *E. coli*, RecU chez *B. subtilis*, Yen1/GEN1 pour les eucaryotes) et libère deux molécules d'ADN indépendantes (Ip *et al.*, 2008; Kowalczykowski *et al.*, 1994; Sanchez *et al.*, 2005).

Etape de RH	Processus	Protéines		
		<i>E.coli</i>	<i>S.cerevisiae</i>	humain ^a
Pré-synapse (A-C) ^b	Maturation des extrémités de DSB	RecBCD RecQ, RecJ	MRX, Sgs1, Dna2,Sae2 Exo1	MRN, BLM, DNA2,CtIP EXO1
	Prise en charge de l'ADN simple brin	SSB	RPA	RPA
Synapse (D, E) ^b	Chargement de la recombinase	RecBCD RecFOR	Rad52, Rad55/Rad57	Rad52, Les paralogues de Rad51, BRCA2,XRCC2,XRCC3
	Envahissement du brin	RecA	Rad51 Dmc1 Rad54	Rad51 Dmc1 Rad54
Post-synapse (F, G) ^b	Migration de la croix	RuvAB RecG	Rad54	Rad54 BLM WRN
	Résolution	RuvC	Yen1	Mus81-Eme1 GEN1

Tableau 1. Protéines impliquées dans les différentes étapes de la recombinaison homologue.

^a Certaines protéines citées peuvent avoir d'autres fonctions pendant la recombinaison homologue. De plus, les activités redondantes pour certains processus sont indiquées.

^b Les lettres correspondent aux différentes étapes de la recombinaison homologue illustrées dans figure 6.

● Le rôle biologique de la RH

Chez les eucaryotes, la recombinaison homologue est surtout connue pour la formation des crossing-overs assurant le brassage génétique et l'homogénéisation

du pool génétique de l'espèce. Cependant, la RH est impliquée dans le fonctionnement même de la méiose. En effet, le mécanisme de la recombinaison permet de repousser les chromosomes homologues dans les cellules filles pendant la première division méiotique assurant la ségrégation correcte (étape réductionnelle). De plus, la RH peut maintenir la stabilité génomique de la cellule somatique en favorisant la réparation des DSB, la réparation des télomères et celle des fourches de réplication effondrées.

Par ailleurs, la RH peut être source de diversification de l'information génétique. En effet, si l'homologue utilisé lors de l'appariement est divergent d'un point de vue nucléotidique, la recombinaison reproduit ces divergences lors de la phase de synthèse d'ADN, et le déplacement des jonctions de Holliday forment des hétéroduplexes au sein de l'intermédiaire de recombinaison. L'intervention du système mismatch repair (MMR) fixera ou non les divergences. Ce mécanisme est connu sous le nom de conversion génique. Ce phénomène est observé à chaque événement de recombinaison, et constitue tout autant un mécanisme de création de variabilité (transfert unilatéral d'information génique) que d'homogénéisation de l'information (Wyman *et al.*, 2004).

La RH peut engendrer des modifications de la structure du génome. Au cours de la méiose mais également en mitose, des événements de crossing-over entre séquences non allèles peuvent engendrer des réarrangements chromosomiques (crossing-overs inégaux) (Pfeiffer *et al.*, 2000). La RH est également impliquée dans l'acquisition de matériel exogène, notamment chez les bactéries lors du transfert horizontal.

Chez les bactéries, la RH est importante dans la réparation fidèle de DSB, mais également dans le processus restauration de la fourche de réplication, processus

appelé réplication RH-dépendante (RDR pour Recombination-Dependent Replication) (figure 7). Kogoma et ses collègues ont focalisé sur l'interaction entre la recombinaison et la réplication. Les acteurs de la RH sont impliqués dans deux processus d'initiation de la réplication indépendants d'*oriC* (origine de réplication bactérienne canonique) (Asai *et al.*, 1993, 1994; Kogoma, 1997). Le premier, nommé iSDR (pour induced-stable DNA replication) implique les acteurs de la RH (RecA, RecBCD, le site *chi* et la protéine PriA) et est initié à la D-loop. Alternativement, l'autre processus, appelé cSDR (pour constitutive-stable DNA replication), implique RecA et PriA et commence à la R-loop ; il s'agit d'une structure dans laquelle l'ARN s'apparie au sein de l'ADN double brin, et déplace le brin complémentaire) (Kowalczykowski, 2000). Kuzminov (2001) a proposé que le RDR fonctionne à chaque cycle cellulaire pour restaurer les fourches de réplication effondrées à causes de dommages non réparés présents dans l'ADN en cours de réplication.

La plupart des enzymes en jeu dans le processus de recombinaison a été découverte par l'examen de mutants d'*E. coli* déficients pour la recombinaison. L'analyse génétique a établi que la recombinaison requiert des activités spécifiques ainsi que des activités généralistes du métabolisme de l'ADN comme des ADN polymérase (fidèles ou infidèles), l'ADN ligase (DNA ligase I) et les protéines se fixant à l'ADN simple-brin (SSB). Chez les eucaryotes, un grand nombre de protéines, la plupart monofonctionnelles, sont impliquées dans la recombinaison homologe, contrastant avec le cas bactérien où un nombre plus réduit de protéines multifonctionnelles est impliqué.

Dans la suite de l'introduction, je focaliserai sur les activités enzymatiques de l'étape pré-synaptique chez les bactéries, car c'est sur elles que porte le sujet principal de mon travail de recherche.

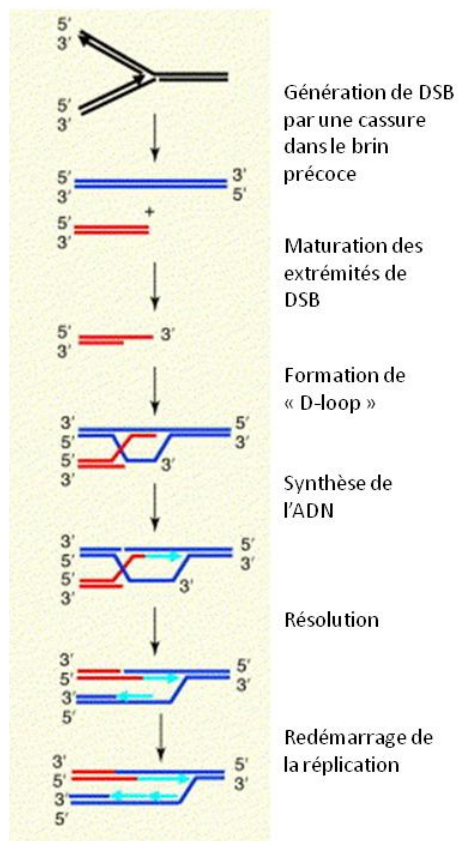


Figure 7. Modèle de la réplication recombinaison-dépendante

● Les enzymes impliquées dans la maturation des extrémités des DSB

Chez les bactéries, les hélicases-nucléases impliquées dans la maturation des extrémités des DSB sont divisées en trois familles dont les représentants majeurs sont respectivement RecBCD d'*E. coli*, AddAB de *B. subtilis* et AdnAB de *M. tuberculosis*. RecBCD.

a) RecBCD

Le complexe protéique RecBCD est composé de trois sous-unités ; RecB, RecC et RecD. Alors que *recB* et *recD* constituent un opéron, *recC* est transcrit indépendamment (Sasaki *et al.* 1982; S. K. Amundsen *et al.* 1986; Finch, Storey, *et al.* 1986). Ces gènes n'appartiennent pas au régulon SOS : ils ne sont pas inductibles par les dommages à l'ADN (Hickson *et al.*, 1984, 1985). De plus, la quantité de cette

enzyme est strictement régulée : il est estimé que seulement 10 molécules sont présentes par cellule d'*E. coli* (pour revue: Dillingham et Kowalczykowski, 2008).

La structure de RecBCD

Dans ce complexe, la sous-unité RecB est une protéine de 1180 acides aminés portant les motifs caractéristiques d'une hélicase de la superfamille 1 (SF1) dans l'extrémité N-terminale et d'une nucléase à l'extrémité C-terminal (Gorbalenya et Koonin, 1993) (Aravind *et al.*, 2000). RecB présente une activité ATPasique ADN dépendante couplée avec une activité hélicase faible orientée de 3' vers 5'. RecD est une protéine de 608 aa qui possède elle aussi les motifs hélicase de la famille SF1. En effet, RecD possède une activité ATPasique ADN simple-brin dépendante et une activité hélicase de polarité 5' vers 3'. En revanche, la sous-unité RecC (1122 aa) ne possède pas de motifs protéiques caractéristiques ni des hélicases ni des nucléases mais a la capacité de reconnaître le site *chi* (figure 8).

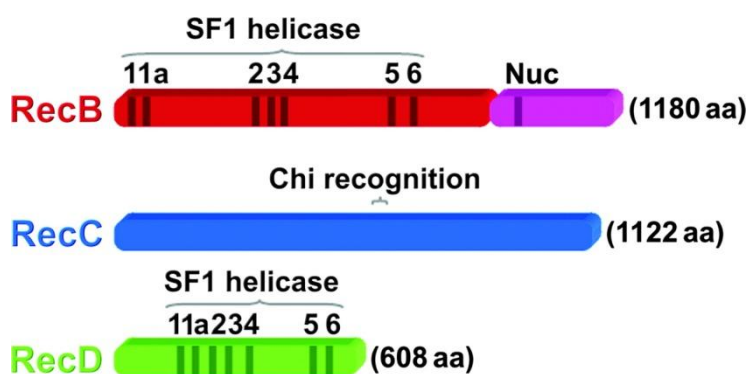


Figure 8. Structure primaire de l'enzyme RecBCD. D'après Dillingham et Kowalczykowski (2008)

Le domaine N-terminal de RecB (rouge) contient 7 motifs (indiqués par les numéros) de hélicase SF1. Son domaine C-terminal (magenta) contient des motifs caractéristiques d'une famille de nucléases. « Nuc » révèle la position de motif 3 qui porte les résidus catalytiques clés (D1067, D1080 et K1082) (Yu *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000). La protéine RecC (bleu) ne montre pas d'homologie significative avec les autres protéines connues. Une région de RecC impliquée dans la reconnaissance du site *chi* est indiquée. La protéine RecD (vert) contient les 7 motifs hélicase SF1 (indiqués par les numéros). Le nombre d'acides aminés dans chaque protéine est indiqué en parenthèse.

Le mécanisme de la voie RecBCD

Le complexe enzymatique RecBCD présente plusieurs activités essentielles pour la RH. La voie de recombinaison dépendant de RecBCD est bien décrite chez *E. coli* (figure 9). Lors de la formation d'une DSB, RecC s'associe fortement aux extrémités (franches ou non) de la cassure. RecB et RecD déroulent l'ADN double brin grâce à leur activité hélicase. Leur interaction avec RecC stimule l'activité hélicase (Masterson *et al.*, 1992).

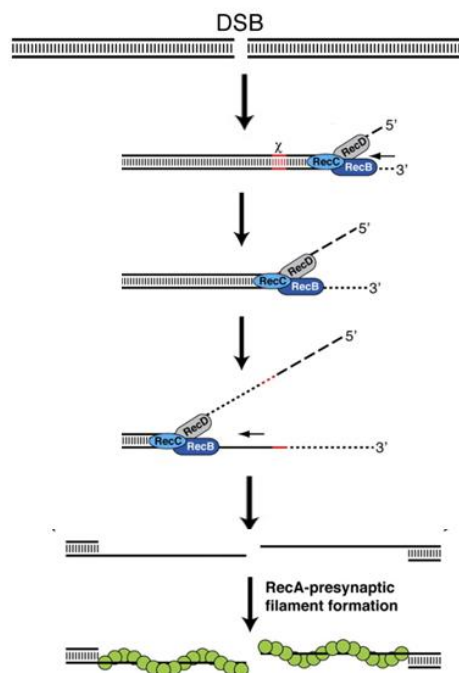


Figure 9. Maturation des extrémités des DSB chez les bactéries catalysée par RecBCD. D'après Niu *et al.*(2009)

Les fragments d'ADN courts libérés par le clivage nucléolytique sont indiqués par des lignes en pointillés.

de façon concomitante avec la progression du complexe, l'ADN sous forme simple brin est dégradé, notamment par la sous unité RecB, mais avec une efficacité supérieure dans la polarité 3' vers 5'. Lorsque la sous unité RecC rencontre une séquence spécifique appelée site *chi* (5'-GCTGGTGG-3') (Arnold *et al.*, 2000; Khidhir *et al.*, 1985), l'enzyme RecBCD voit son activité nucléase modifiée : l'activité 3' vers 5' est diminuée alors que l'activité 5' vers 3', elle, est stimulée (figure 9). Finalement,

RecB peut interagir directement avec la protéine RecA et facilite son chargement sur l'ADN simple brin. Cette étape initie la formation du filament pré-synaptique. (Dillingham et Kowalczykowski, 2008; Anderson et Kowalczykowski, 1997; Dixon et Kowalczykowski, 1991, 1993).

Le rôle biologique de RecBCD

RecBCD constitue l'acteur clé de la réparation des DSB par la RH. On estime qu'entre 95% et 99% des événements de réparation de DSB sont dépendants de ce complexe chez *E. coli* (pour revue Dillingham et Kowalczykowski, 2008). Les mutations affectant les activités RecB ou RecC réduisent la fréquence de recombinaison d'un facteur 100 à 1000, et impactent fortement la viabilité cellulaire en absence de stress génotoxique. *A fortiori*, ces mutations provoquent une forte augmentation de la sensibilité aux agents endommageant l'ADN (rayonnement UV, gamma, exposition à la MMC) (Kowalczykowski *et al.*, 1994; Arnold et Kowalczykowski, 1998; Emmerson 1968; Capaldo, Ramsey, et Barbour 1974). En revanche, les mutants de *recD* présentent une résistance, une viabilité et des fréquences de recombinaison comparables à celle de la souche sauvage.

Outre son rôle majeur dans la recombinaison homologue, le complexe RecBCD participerait à la protection contre les virus (pour revue Dillingham et Kowalczykowski, 2008). En effet, l'activité nucléasique, dirigée contre l'ADN simple et double brin, dégraderait plus de 90% de l'ADN entrant. Il est à noter que certains virus ont développé une parade. Le phage λ produit la protéine Gam qui protège son génome viral linéaire de la dégradation en inhibant la fixation de RecBCD sur l'ADN (Karu *et al.*, 1975). De même, chez le phage T4, le gène 2 produit une protéine qui, associée à l'extrémité du génome, le protège de la dégradation (Oliver et Goldberg, 1977). Enfin, les extrémités du phage N15 adopte une structure

tige-boucle qui les rend inaccessibles à la dégradation par RecBCD (Malinin *et al.*, 1992).

b) AddAB

Les propriétés biochimiques d'AddAB

Une autre famille d'hélicase-nucléase a été identifiée principalement chez les bactéries Gram-positives ainsi que chez certaines protéobactéries, c'est AddAB (ATP-dépendent DNase) (Chédin *et al.*, 1998, 2000; Chédin et Kowalczykowski, 2002) (figure 10). Au sein de l'hétérodimère, la sous unité AddA est homologue de RecB et possède un domaine hélicase de type SF1 à l'extrémité N-terminal et un

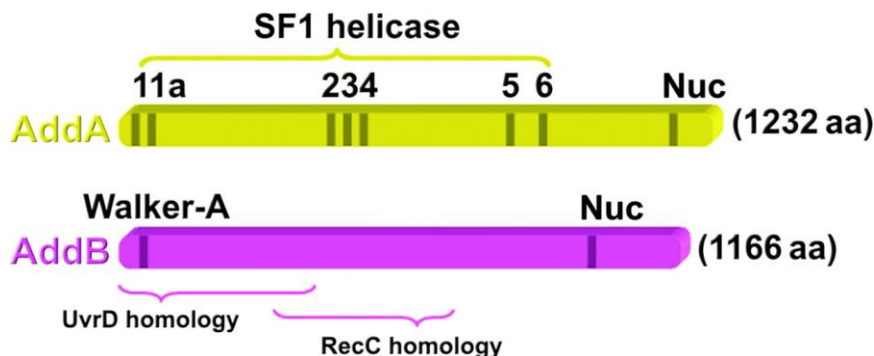


Figure 10. Structure primaire de l'enzyme AddAB. D'après Dillingham et Kowalczykowski (2008)

La protéine AddA (jaune) est un homologue structural de RecB; le domaine N-terminal contient les 7 motifs hélicase SF1 (indiqués par les numéros) et le domaine C-terminal contient les motifs nucléase. La position d'un résidu aspartate potentiellement catalytique est marquée « Nuc ». La protéine AddB (magenta) montre une homologie faible avec l'ADN hélicase SF1 UvrD-like et avec la protéine RecC au niveau des régions indiquées. Un motif « Walker A » impliqué dans la fixation et l'hydrolyse de NTP, et équivalent au motif 1 hélicase, est observé dans l'extrémité N-terminale. Les motifs nucléase équivalents à ceux qui sont détectés dans RecB et AddA sont présents dans la région C-terminale d'AddB. Le nombre d'acides aminés de chaque protéine est indiqué en parenthèse.

domaine nucléase en C-terminal. En revanche, AddB ne présente aucune homologie significative avec RecC ou RecD. L'extrémité N-terminale d'AddB montre une homologie faible avec des hélicases de la famille SF1, famille à laquelle RecB et RecD appartiennent, ainsi qu'un motif Walker A conservé. Une région de faible homologie

avec RecC est trouvée dans la partie centrale, les motifs de nucléase quant à eux sont caractérisés en C-terminal. En conséquence, AddB possède une architecture unique ressemblant à un hybride entre RecB et RecC.

Malgré les dissimilarités entre les structures primaires de RecBCD et AddAB, le complexe AddAB est l'analogue du complexe RecBCD (Chédin *et al.*, 2000). Ils catalysent tous deux des activités hélicases régulées par le site *chi* et des activités nucléases. La reconnaissance de *chi* par AddAB éteint l'activité nucléase de 3' vers 5' alors que la dégradation de 5' vers 3' du brin complémentaire n'est pas affectée, générant une extrémité 3' OH sortante (figure 11).

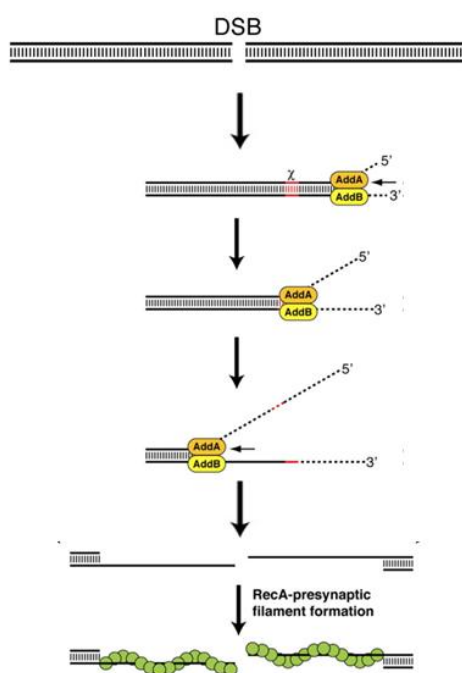


Figure 11. Maturation des extrémités des DSB chez les bactéries catalysée par AddAB. D'après Niu *et al.*(2009).

Les fragments d'ADN courts libérés par le clivage nucléolytique sont indiqués par des lignes en pointillés.

La séquence *chi* de *Bacillus subtilis* (5'-AGCGG-3') ne partage que 5 des 8 nucléotides du motif (5'-GCTGGTGG-3') reconnu par RecBCD chez *E. coli*. Il a donc été suggéré que l'activité hélicase-nucléase et la séquence de *chi* aient co-évolué

dans les différents phyla bactériens.(Chédin et Kowalczykowski, 2002; Quiberoni *et al.*, 2001)

Le rôle biologique d'AddAB

AddAB de *B. subtilis* est un homologue fonctionnel de RecBCD d'*E. coli* car AddAB peut restaurer le taux de survie d'un mutant *recBCD* d'*E. coli* avec ou sans stress génotoxique tel que l'exposition aux UV (Kooistra *et al.*, 1993). Il a par ailleurs été montré que la mutation d'AddAB confère une légère réduction de la résistance de *B. subtilis* en réponse aux agents endommageant l'ADN comme le méthanesulfonate de méthyle (MMS) ou encore la MMC (Sanchez *et al.*, 2006). AddAB serait ainsi un acteur majeur de la réparation de l'ADN.

c) AdnAB

Jusqu'en 2009, RecBCD et AddAB constituent les deux familles d'hélicase-nucléase connues chez les bactéries. Une distribution phylogénétique de RecBCD et d'AddAB avait été établie en 2009 par Cromie (2009) et montrait que la plupart des génomes bactériens séquencés (92%, 474/513) codait l'un ou l'autre ou les deux complexes. De rares lignées appartenant aux phyla *Aquificae* et *Chloroflexi* n'exprimeraient selon cette étude aucun des deux complexes. Seules 24 espèces présentaient simultanément les deux complexes suggérant une évolution alternative des deux familles d'hélicase-nucléase. Dans les cas où les deux systèmes sont présents, il est suggéré que l'un ou l'autre résulterait d'acquisition par transfert horizontal (Cromie, 2009). Les *Mycobacterium* spp. et d'autres espèces d'actinobactéries sont assignées à cette catégorie. Dans une autre étude, Rocha *et al.* (2005) n'avaient pas conclu à la présence d'AddAB chez les mycobactéries.

Cette incohérence apparente a récemment été levée par le travail de Sinha *et al.* (2009). Lors d'études chez *M. smegmatis*, il a été montré que la délétion du locus homologue de *recBCD* n'entraînait pas de sensibilité aux agents génotoxiques (sensibilité à UV) ni ne perturbait l'efficacité et la fidélité de la recombinaison NHEJ (Stephanou *et al.*, 2007 ; Aniuoku *et al.*, 2008). En fait, un nouveau complexe hélicase-nucléase, nommé AdnAB (Adn pour ATP-dependent nuclease), a été caractérisé. Il apparaît finalement que ce complexe a probablement été annoté comme AddAB lors de l'étude de Cromie (2009) chez *Mycobacterium* spp.

Le complexe AdnAB est composé de deux sous-unités AdnA et AdnB, codées par les gènes *adnA* et *adnB*, respectivement. Les deux gènes sont co-localisés dans le chromosome et leur organisation en opéron a été proposée par les auteurs des travaux (Sinha *et al.*, 2009). Les sous-unités AdnA et AdnB sont composées toutes les deux d'un domaine hélicase en N-terminal et d'un domaine nucléase en C-terminal (Sinha *et al.*, 2009). Les deux sous-unités du complexe possèdent une activité hélicase. Une activité nucléase ATP-dépendante et ATP-indépendante est présente respectivement sur AdnB et AdnA. La modification de l'extrémité des DSB par AdnAB est couplée à l'activité ATPase qui peut être activée par l'ADN double brin linéaire. L'activité ATPase expose les simples brins formés à l'activité de nucléase qui dégrade le simple brin 5' sortant, et ainsi produit des ADN simples brins 3'OH sortants.

Les connaissances sur le rôle physiologique d'AdnAB sont encore limitées. Cependant, la délétion d'*adnAB* de *M. smegmatis* est possible et confère à la cellule un phénotype de sensibilité aux radiations ionisantes suggérant son implication dans la résistance aux agents génotoxiques et dans la réparation de l'ADN (Unciuleac et Shuman, 2010).

d) RecQ/J

En plus des trois familles majeures d'hélicase-nucléase, d'autres voies alternatives sont impliquées dans la maturation des extrémités des DSB.

Dans l'exemple de la voie RecFOR, la protéine RecQ agit en tant qu'hélicase et sépare les brins d'ADN du duplex à partir de la cassure. RecJ grâce à son activité exonucléase 5' vers 3' forme une extrémité 3'OH libre où se fixent des monomères de la protéine SSB. Ensuite, le complexe RecFOR est chargé sur le filament et stabilise RecA pour permettre la formation de filament pré-synaptique (Kowalczykowski, 2000).

Chez *B. subtilis*, RecQ peut être substituée par RecS, appartenant à la famille RecQ-like. Le complexe RecQ/RecJ peut alors catalyser la maturation des extrémités (Sanchez *et al.*, 2006). Chez *Acinetobacter baylyi*, RecJ, associé à une hélicase UvrD-like (Rep, PcrA) ou d'autres hélicases, peut également procéder à la maturation des extrémités de DSB (Kickstein *et al.*, 2007).

1.3.2.2. Le mécanisme NHEJ : Non Homologous End Joining

Dans les années 1980, un mécanisme impliqué dans l'intégration de certains virus dans les génomes de mammifères a été découvert (Wilson *et al.*, 1982; Winocour et Keshet, 1980). Après trois décennies de recherche, ce mécanisme est désormais connu comme le Non-Homologous End Joining ou NHEJ qui permet de religuer des extrémités d'ADN issues de molécules sans homologies de séquences.

Il a longtemps été admis que ce mécanisme était l'apanage des eucaryotes, le modèle bactérien *E. coli* étant incapable notamment de recirculariser le plasmide linéaire. Dans les cellules eucaryotes, plusieurs facteurs sont recrutés dans le processus de NHEJ (figure 12). Les DSB sont reconnues initialement par le

complexe Ku70/Ku80 chez la levure auquel s'ajoute, chez les mammifères DNA-PKcs (une protéine kinase ADN-dépendante) ; le complexe MRX de la levure ou MRN chez les mammifère stimule le pontage des extrémités des DSB ; Les complexes ADN ligase IV consistant en une sous-unité catalytique ADN ligase IV et son cofacteur XRCC4 (chez les mammifères) ou Dnl4/Lif1 (chez la levure) effectuent l'étape de ligation de la réparation (Chen *et al.*, 2001; DeFazio *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 1997; Zha *et al.*, 2009).

Non-homologous end-joining

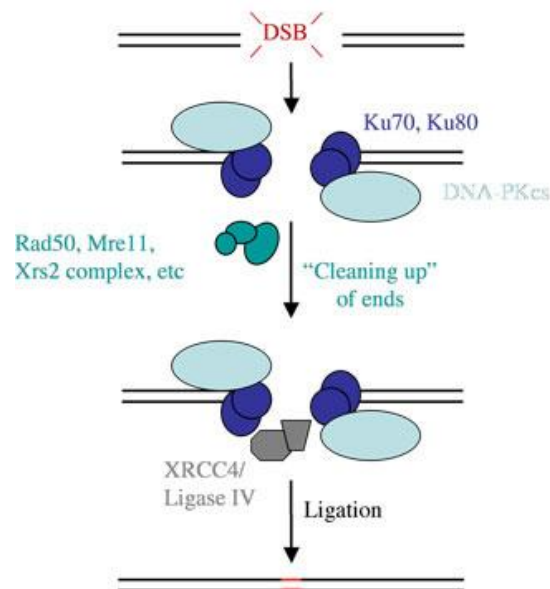


Figure 12. Modèle du mécanisme NHEJ

Cependant, depuis une dizaine d'années, la mise en évidence d'homologue de Ku dans des génomes bactériens par recherche bioinformatique ainsi que des résultats expérimentaux obtenus chez les mycobactéries (circularisation incorrecte de molécules linéaires transformantes (Gong *et al.*, 2005)) ont permis de suspecter l'existence d'un NHEJ bactérien. Des analyses biochimiques, structurales et

génétiques des homologues Ku et des ligases dans divers modèles bactériens tels que *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Agrobacterium* ont ensuite été réalisées pour décrire la voie NHEJ et les activités enzymatiques associées.

- Les protéines impliquées dans le NHEJ bactérien

Le NHEJ eucaryote implique de nombreux facteurs dont Ku70/Ku80, DNA-PKcs, ligase IV/XRCC4. Chez les bactéries, le nombre d'acteurs est réduit et deux activités semblent suffire à réaliser la fonction : la protéine Ku identifie les extrémités de la cassure et recrute la ligase D qui élimine l'interruption de l'ADN en reliant deux molécules d'ADN.

a) Les protéines Ku

La protéine Ku est un composant primaire du système NHEJ qui peut se fixer sur l'ADN. Chez les eucaryotes, elle est sous forme hétérodimérique (Ku70/Ku80) et recrute le complexe ligase IV/XRCC4 après avoir lié à l'ADN.

Initialement, une analyse par des génomes bactériens et d'archées a identifié un certain nombre des gènes montrant une homologie significative avec Ku70 et Ku80 des eucaryotes (PSI-BLAST) (Doherty *et al.*, 2001) (figure 13). Ces gènes homologues de *ku* ont été détectés principalement en copie unique dans les génomes bactériens (*Mesorhizobium loti* faisant exception avec *mlr9624* et *mlr9623*) et sont co-localisés avec un gène codant une activité ligase, le second acteur du NHEJ. Les Ku bactériennes semblent dépourvues des extensions de leurs homologues eucaryotes : l'extension N-terminale où se localise le domaine A du facteur von Willebrand qui est un domaine de l'interaction protéine-protéine) et l'extension C-terminale portant le domaine SAP (pour SAF-A/B, Acinus and PIAS) impliqué dans l'interaction avec l'ADN) (Walker *et al.*, 2001). On notera toutefois

l'exception de SCO0601 (ou SCF55.25c) de *S. coelicolor* qui présente en C-terminal une homologie importante avec le domaine SAP de Ku70 eucaryote.

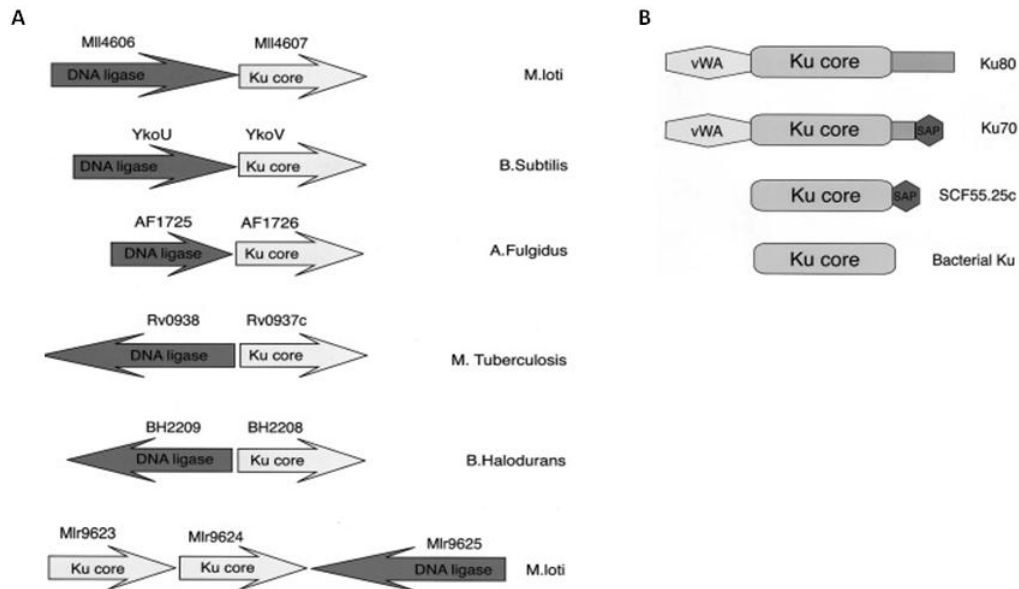


Figure 13. Organisation concernant la protéine Ku. D'après Doherty *et al.* (2001)

A: Organisation des opérons putatifs de Ku bactériens au sein de plusieurs génomes. B: Environnement des gènes *ku* au sein de plusieurs génomes bactériens.

Des études biochimiques *in vitro* ont permis de caractériser les Ku des bactéries. Ces protéines fonctionnent sous forme d'homodimères stables et capables de fixer préférentiellement l'ADN au niveau de l'extrémité de DSB. La région C-terminale de Ku de *M. smegmatis*, riche en lycine, lui confère la capacité d'interagir avec l'ADN exempt de cassures, ce qui pourrait faciliter le recrutement de Ku aux sites d'ADN endommagé (Weller *et al.*, 2002; Kushwaha et Grove, 2013). De plus, Ku recrute la ligase sur les extrémités d'ADN et stimule son activité (Weller *et al.*, 2002). Ces résultats montrent un fonctionnement similaire à celui du NHEJ eucaryote et bactérien malgré les divergences de structure des protéines.

Par ailleurs, les protéines Ku eucaryotes sont également impliquées dans d'autres processus cellulaires clé comme l'apoptose, la transcription, le maintien des télomères ou l'adhésion cellulaire (pour revue Downs et Jackson, 2004) alors que leurs homologues bactériens ne sont pas à ce jour impliqués dans le NHEJ (Doherty et Jackson, 2001; Walker *et al.*, 2001). Les analyses génétiques chez *B. subtilis* et *M. smegmatis* ont montré que les mutations dans le gène *ku* peuvent induire une augmentation forte de la sensibilité aux agents endommageant l'ADN dans certains contextes (Weller *et al.*, 2002; Pitcher *et al.*, 2007a; Shuman et Glickman, 2007).

b) Ligase

Deux catégories fonctionnelles de ligases bactériennes sont distinguées : ligases NAD⁺-dépendantes (LigA) et ATP-dépendantes (LigB, LigC et LigD). Par ailleurs, parmi ces ligases, les gènes codant LigD sont co-localisés avec un gène *ku* chez plusieurs espèces bactériennes, suggérant que ces gènes *ku* et *ligD* seraient si ce n'est co-exprimés, impliqués dans le même mécanisme (Aravind *et al.*, 1999; Doherty *et al.*, 2001; Koonin *et al.*, 2000; Weller et Doherty, 2001). Depuis, le fait que LigD est un acteur principal du NHEJ est démontré (Malyarchuk *et al.*, 2007).

Ligase D

Chez les bactéries, LigD comprend plusieurs domaines fonctionnels : un domaine polymérase (PolDom), un domaine de ligase (LigDom) et souvent un domaine nucléase (NucDom)(Aravind et Koonin, 2001; Weller et Doherty, 2001;Iyer *et al.*, 2006).

L'organisation de ces domaines au sein de LigD est très variée. Chez *M.tuberculosis*, PolDom se présente dans la région N-terminale, NucDom est dans la région centrale et LigDom est dans la région C-terminale ; chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Agrobacterium tumefaciens*, NucDom est dans la région N-terminale, LigDom est

central et PolDom se trouve dans la partie C-terminale (Aravind et Koonin, 2001; Weller et Doherty, 2001; Zhu et Shuman, 2005a, 2007). Dans certaines d'autres espèces. LigD ne possède pas tous les domaines, par exemple, LigD de *B. subtilis* (YkoU) ne contient pas de domaine nucléase (NucDom) (figure 14).

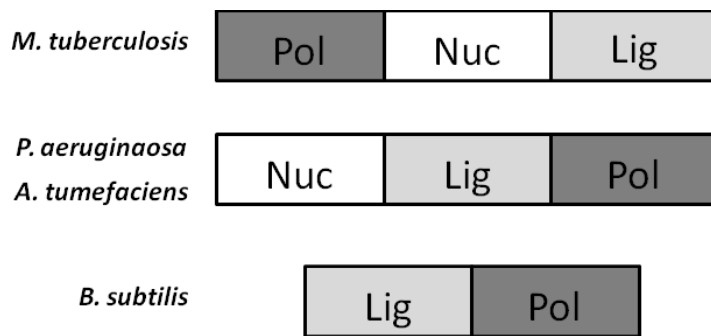


Figure 14. Organisation des multidomaines de LigD.

Pol, Nuc et Lig correspondent aux domaines PolDom, NucDom et LigDom respectivement.

i) PolDom

L'activité PolDom appartient à la superfamille des Archaeo Eukaryotic Primase (AEP) et est capable d'incorporer des désoxyribonucléotides ou des ribonucléotides à l'ADN en présence ou en absence de matrice *in vitro*. L'inactivation de l'activité polymérase de LigD abolit la capacité d'insérer les nucléotides sans matrice aux extrémités franches des DSB (Pitcher *et al.*, 2007b; Aniukwu *et al.*, 2008). Chez les mycobactéries, il a également été démontré *in vitro* que le domaine PolDom est partie prenante d'interaction physique entre Ku et LigD, interaction qui pourrait être responsable du recrutement de LigD au niveau du complexe Ku-DSB *in vivo* (Pitcher *et al.*, 2005a). La plupart des LigD procaryotiques contiennent un domaine PolDom suggérant que ce mécanisme pourrait être conservé.

ii) NucDom

LigD de *M. tuberculosis* présente une activité exonucléasique 3'-5' dépendante du Mg^{2+} (Della *et al.*, 2004) capable de modifier l'ADN double-brin avec extrémité 3'

sortante. C'est chez *P. aeruginosa* que la caractérisation fonctionnelle la plus poussée a été entreprise sur l'activité NucDom. L'activité NucDom peut éliminer séquentiellement des dNTPs ou NTPs, libérant des mononucléosides à partir de l'extrémité 3' du duplex. NucDom de *P. aeruginosa* possède aussi une activité 3' phosphatase éliminant le groupe phosphate à l'extrémité 3' sortante (Zhu et Shuman, 2005b, 2006; Zhu *et al.*, 2005).

iii) LigDom

Le rôle de LigD dans le NHEJ a été mis en évidence chez *M. smegmatis*, son absence inhibe la capacité à religuer des extrémités double brin (Gong *et al.*, 2005). Plus précisément, c'est le domaine C-terminal de LigDom de *M. tuberculosis* qui est responsable de l'étape d'adénylation et de ligation ATP-dépendante. La mutation de la lysine du site actif de LigDom de *M. tuberculosis* empêche l'autoadénylation, inhibant ainsi la ligation (Akey *et al.*, 2006; Gong *et al.*, 2004; Pitcher *et al.*, 2005a). Cependant, malgré la délétion de *ligD* dans les cellules, une activité NHEJ est toujours notable ce qui montre l'existence d'une voie alternative LigD-indépendante.

LigC

LigC est une autre ligase ATP-dépendante. Chez *M. smegmatis*, la délétion de *ligC* n'impacte pas l'efficacité du NHEJ. En revanche, dans le contexte mutant $\Delta ligD$, l'absence de *ligC* diminue la fréquence de réparation des DSB par NHEJ d'un facteur 20 (Gong *et al.*, 2005). L'activité LigC apparaît comme une voie redondante mineure de LigD, une voie de sauvegarde. Le double mutant *ligC-ligD* montre un phénotype comparable au mutant Δku montrant que l'abolition des activités ligases ATP dépendantes abolit le NHEJ chez *M. smegmatis* (Gong *et al.*, 2005).

LigA

LigA, NAD⁺-dépendante, est essentielle, de part son implication dans la réplication, pour la croissance chez *E. coli* (Konrad *et al.*, 1973). Elle n'est pas impliquée dans le NHEJ mais semble jouer un rôle dans un mécanisme qui peut joindre les extrémités indépendamment de Ku et LigD chez *E. coli* (Chayot *et al.*, 2010) : le mécanisme, nommé A-EJ (pour Alternative end-joining), est caractérisé par la fréquente modification bidirectionnelle des extrémités et l'importance d'existence de microhomologie. Cela ont démontré qu'il est distinct de NHEJ (Chayot *et al.*, 2010).

- Le rôle physiologique de NHEJ bactérien

Le système NHEJ n'est pas conservé chez toutes les espèces bactériennes. En fait, les gènes *ku* sont manifestement absents dans la plupart des espèces bactériennes. Ils sont largement distribués chez les protéobactéries (α , β , γ et δ), les firmicutes et les actinobactéries (e.g. *Mycobacterium tuberculosis*) (figure 15). La délétion des gènes codant les acteurs du NHEJ chez les bactéries n'a pas de phénotype marqué dans les conditions de croissance en laboratoire (Bowater et Doherty, 2006) suggérant le caractère non essentiel de ce mécanisme. Sa distribution ne suivant pas une logique phylogénétique, on peut se demander si elle répond à un style de vie particulier. Les espèces bactériennes porteuses du NHEJ partagent en effet une caractéristique dans leur cycle biologique : soit ce sont des bactéries sporulantes (*B. subtilis*, *Streptomyces*), soit elles passent une grande partie de leur cycle biologique en phase stationnaire comme *M. tuberculosis*. Dans les deux cas, il s'agit de phase unigénomique où la réparation d'une DSB ne peut pas s'effectuer par RH puisqu'il n'y a pas de chromatide sœur et pourrait donc requérir le NHEJ.

Chez *B. subtilis*, les souches mutantes pour *ykoV* (Ku) et *ykoU* (LigD), amenées en phase stationnaire, sont légèrement mais significativement plus sensibles aux radiations ionisantes que la souche sauvage. Ce sont les spores plutôt que les

cellules en phase stationnaire qui requièrent le système NHEJ (Weller *et al.*, 2002). De plus, la localisation cellulaire de la protéine Ku (fusion GFP) ainsi que son profil d'expression (dépendante d'un facteur tardif, σ_G) renforce l'hypothèse de la participation du NHEJ dans la réparation des DSB au cours de la germination (Wang *et al.*, 2006).

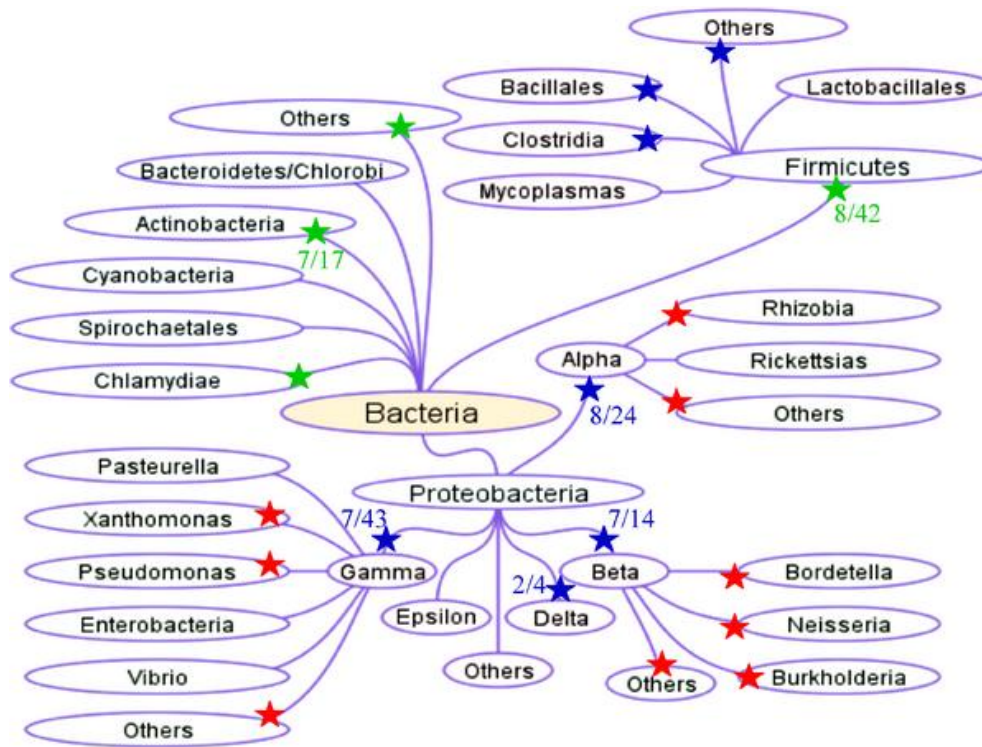


Figure 15. Distribution phylogénétique de la protéine Ku chez les bactéries. D'après Bowater et Doherty (2006).

Une représentation schématique des liens phylogénétiques des différents groupes bactériens est montrée. Les étoiles indiquent les phyla qui contiennent des homologues de Ku. Les chiffres indiquent la proportion des génomes contenant au moins un homologue de *ku* parmi les génomes entièrement séquencés du phylum.

Chez les mycobactéries ne formant pas de spores, les mutations du système NHEJ, augmentent la sensibilité lors de la formation de DSB en phase stationnaire alors qu'en phase exponentielle, la viabilité n'est pas affectée (Pitcher *et al.*, 2007b; Smeulders *et al.*, 1999). De plus, les mutants $\Delta recA$ et $\Delta recA\Delta ku\Delta ligD$ présentent la

même sensibilité aux radiations ionisantes en phase exponentielle tandis que $\Delta recA$ est plus viable que $\Delta recA\Delta ku\Delta ligD$ en phase stationnaire. Ces résultats suggèrent que les mycobactéries utilisent préférentiellement le NHEJ en phase stationnaire alors qu'en phase exponentielle, la RH serait le mécanisme prédominant pour la réparation des DSB (Pitcher et al., 2007b).

6.4. Pourquoi *Streptomyces* comme modèle d'étude de la réparation des DSB ?

Le genre *Streptomyces* désigne des bactéries filamenteuses et sporulantes appartenant à l'ordre des Actinomycètes qui comprend également les genres *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* et *Frankia*. Ce sont des bactéries Gram positives couramment trouvées dans le sol.

Les *Streptomyces* sont des bactéries d'intérêt majeur, tant sur le plan industriel que sur celui de la recherche fondamentale. D'une part, elles suivent un cycle de développement unique chez les bactéries : sur milieu de culture solide, la germination d'une spore donne naissance aux filaments mycéliens à croissance apicale et capables de se ramifier. Lors d'une limitation en éléments nutritifs dans le milieu, sur ce mycélium dit végétatif se différencie ensuite en mycélium aérien. Enfin, les hyphes aériens forment, par septation, des chaînes des spores qui sont des structures de résistance capables de se disséminer et d'initier un nouveau cycle de développement lors du retour de conditions favorables (figure 16). Les spores ne contiennent qu'un seul exemplaire du chromosome alors que le mycélium est constitué des cellules pluri-génomiques. D'autre part, les *Streptomyces* sont à l'origine de la production de très nombreuses molécules bioactives, notamment d'antibiotiques. Il a été estimé que 53% (8700 sur 16500) des antibiotiques connus sont produits par les Actinomycètes dont 40% (6550) par des espèces de *Streptomyces* (Bérdy, 2005) Ces bactéries sont également connues pour les phénomènes d'instabilité spectaculaires qui affectent leur développement colonial et leur génome. (Leblond et Decaris, 1999).

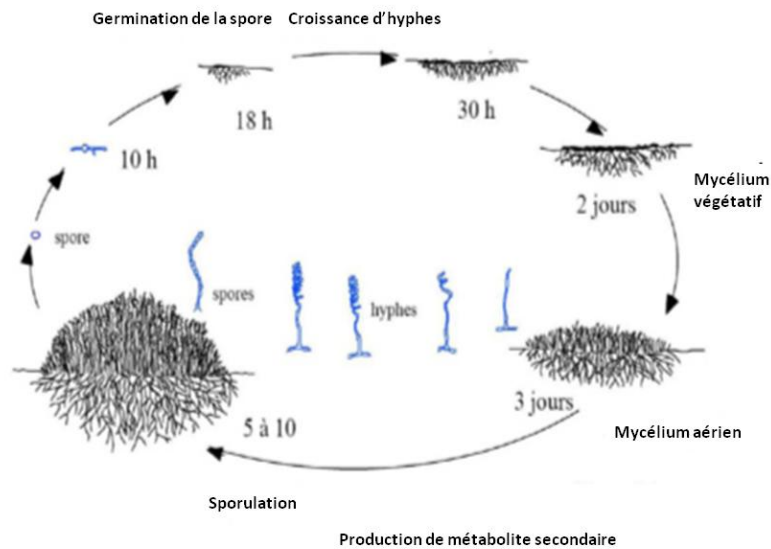


Figure 16. Cycle de développement d'une colonie de *Streptomyces* sur milieu solide.

1.4.1. Une organisation chromosomique originale

Le chromosome des *Streptomyces* présente plusieurs caractéristiques structurales originales : en plus de la particularité d'être linéaire et de grande taille (5-12Mb), l'ADN génomique présente un pourcentage très élevé en bases G+C (71% à 73%). (Lin *et al.*, 1993). Ce chromosome possède à ses extrémités des séquences répétées et inversées, appelées TIR (pour Terminal Inverted Repeat) de composition et de taille variable, liées de manière covalente à des protéines sur l'extrémité 5' (Chen *et al.*, 2002).

Jusqu'à présent, une vingtaine de génomes de *Streptomyces* a été entièrement séquencée, dont celui de l'espèce de référence *Streptomyces coelicolor* (Bentley *et al.* 2002) et de *Streptomyces avermitilis* (Ikeda *et al.* 2003). L'analyse du génome de *S. coelicolor* a permis à Bentley *et al.* de délimiter deux régions sur la base de la fonction des gènes identifiés lors du processus d'annotation : une région « core », localisée au centre du chromosome, qui porte les gènes supposés essentiels à la

survie, et des bras chromosomiques aux deux extrémités du chromosome, portant essentiellement des gènes de contingence.

La comparaison bioinformatique des deux génomes complets de *S. coelicolor* et *S. avermitilis* a montré que la région « core » est fortement synténique entre les deux espèces, c'est-à-dire que cette région présente une forte conservation de l'ordre des gènes au sein des espèces comparées; par contre, les bras chromosomiques présentent les traces de nombreux réarrangements chromosomiques et portent des séquences spécifiques d'espèces (Ikeda *et al.*, 2003). Plus récemment, des études de génomique comparative mettent en évidence une grande variabilité des régions terminales chez l'ensemble des bactéries du genre *Streptomyces*, tant au niveau interspécifique qu'intraspécifique (Choulet *et al.*, 2006). Ces observations sont en accord avec les résultats expérimentaux concernant l'instabilité génomique chez *Streptomyces*.

1.4.2. L'instabilité génétique chez *Streptomyces*

Un phénomène d'instabilité génétique affectant différentes propriétés phénotypiques, semble être omniprésent dans le genre *Streptomyces*. En ce qui concerne les caractères du métabolisme secondaire, il apparaît dans la descendance des souches sauvages, à forte fréquence ($>10^{-3}$), différents types de mutants : sensibles au chloramphénicol chez *S. lividans* (Flett et Cullum, 1987) ou à l'oxytétracycline chez *S. rimosus* (Gravius *et al.*, 1993).

Chez *Streptomyces ambofaciens*, des variants phénotypiques affectés dans la pigmentation apparaissent à haute fréquence (1%) dans la descendance de la souche sauvage (Leblond *et al.*, 1989; Martin *et al.*, 1998). Ce phénomène se traduit par la production de 4 types de colonies dans la descendance d'une colonie pigmentée dite sauvage : des colonies pigmentées (Pig⁺), des colonies dépigmentées

($\text{Pig}^-_{\text{col}}$), des colonies pigmentées à secteur dépigmenté ($\text{Pig}^+_{\text{sec}}$) ou à papilles dépigmentées ($\text{Pig}^+_{\text{pap}}$) (figure 17). Parmi eux, les mutants $\text{Pig}^-_{\text{col}}$ proviendraient soit de la germination d'une spore mutée, soit de la mutation d'une spore sauvage au moment de la germination. Des réarrangements (délétion et/ou amplification) ont été observés dans ces mutants $\text{Pig}^-_{\text{col}}$. Ces réarrangements sont de taille variable, peuvent modifier la taille des TIR et affecter la structure chromosomique (Wenner *et al.*, 2003). Les mutants $\text{Pig}^+_{\text{pap}}$ sont interprétés comme étant issus de mutations se produisant lors de la formation du mycélium aérien.

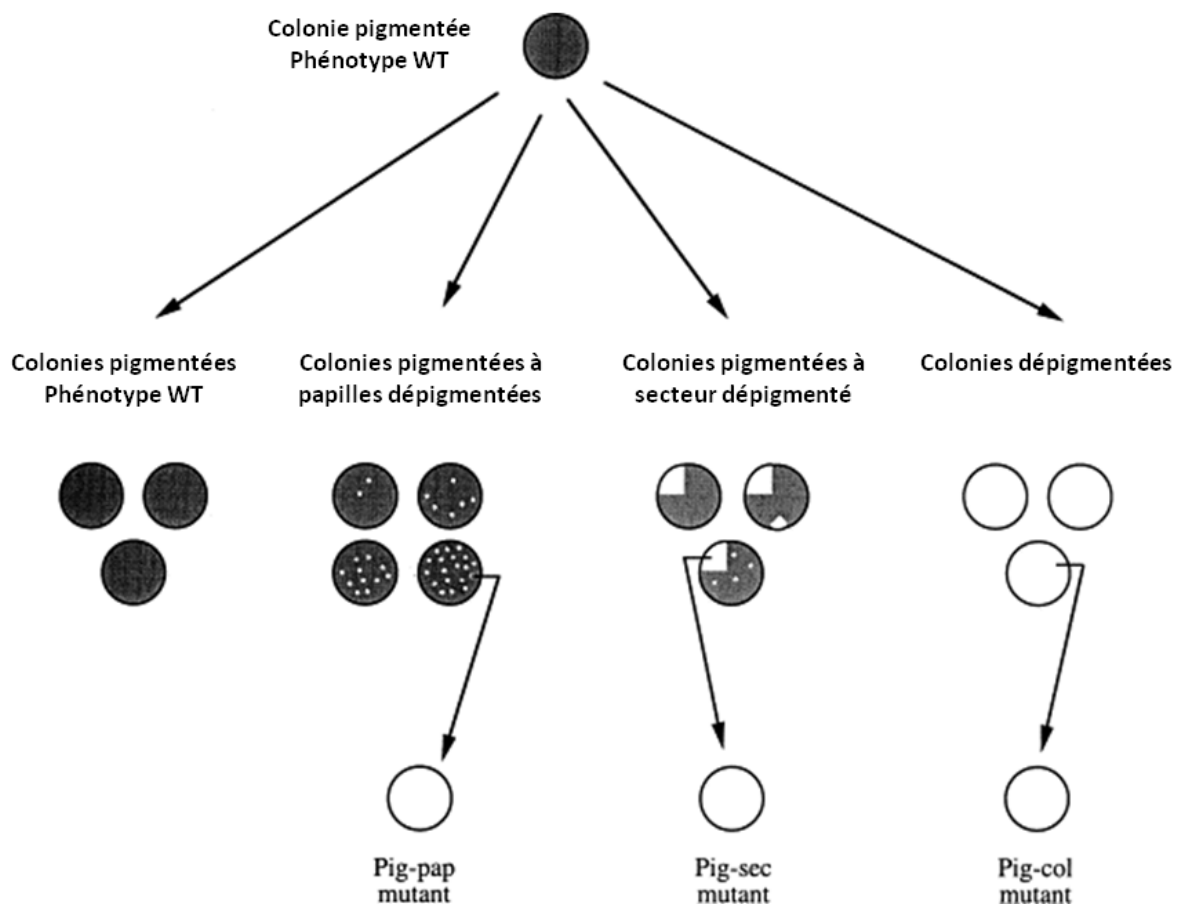


Figure 17. Représentation schématique de la descendance de la souche sauvage. D'après (Martin *et al.*, 1999)

L'instabilité génétique a pu être corrélée à la formation de réarrangements de grande ampleur affectant le chromosome (Birch *et al.*, 1989; Leblond *et al.*, 1991).

Ces réarrangements correspondent à des délétions de grands fragments d'ADN et à des amplifications de loci particuliers. Les régions affectées par ces réarrangements correspondent aux régions terminales du chromosome linéaire. Ces régions sont non essentielles à la croissance de *Streptomyces* en condition de laboratoire. Chez *Streptomyces lividans*, 1Mb peut être perdu en condition de laboratoire (Redenbach *et al.*, 1993). Chez *S.ambofaciens*, les régions dispensables représentent 2,3Mb, soit environ 25% du chromosome englobant les extrémités chromosomiques (Fischer *et al.*, 1997).

1.4.3. Région de synténie dégénérée

La séquençage du génome de *S. ambofaciens* a permis de développer la génomique comparée avec *S. coelicolor* et d'autres *Streptomyces* modèles (Choulet *et al.*, 2006). Cette comparaison a été établie par le calcul du paramètre GOC (pour Gene Order Conservation) qui permet d'évaluer le niveau de synténie entre deux génomes, en dénombrant, dans une fenêtre glissant le long d'un génome la proportion d'orthologues ayant le même voisinage dans les deux génomes comparés. Cette

analyse du GOC, d'une part, a confirmé la conservation de l'ordre des gènes au sein de la région « core » et une faible conservation au sein des bras chromosomiques en comparant les génomes de *S. avermitilis* et *S. coelicolor*, et d'autre part, la comparaison du bras chromosomique droit de *S. ambofaciens* ATCC23877 avec le génome de *S. coelicolor* a montré que le facteur de GOC décroît de façon progressive (de 60% à 20%) sur une région de plusieurs centaines de kilobases à l'approche de l'extrémité du chromosome. Cette région est dénommée région de synténie dégénérée (Choulet *et al.*, 2006) (figure 18). La dégénérescence se caractérise par une multitude d'événements d'insertion/délétions (indels) fixés au cours de la divergence des espèces.

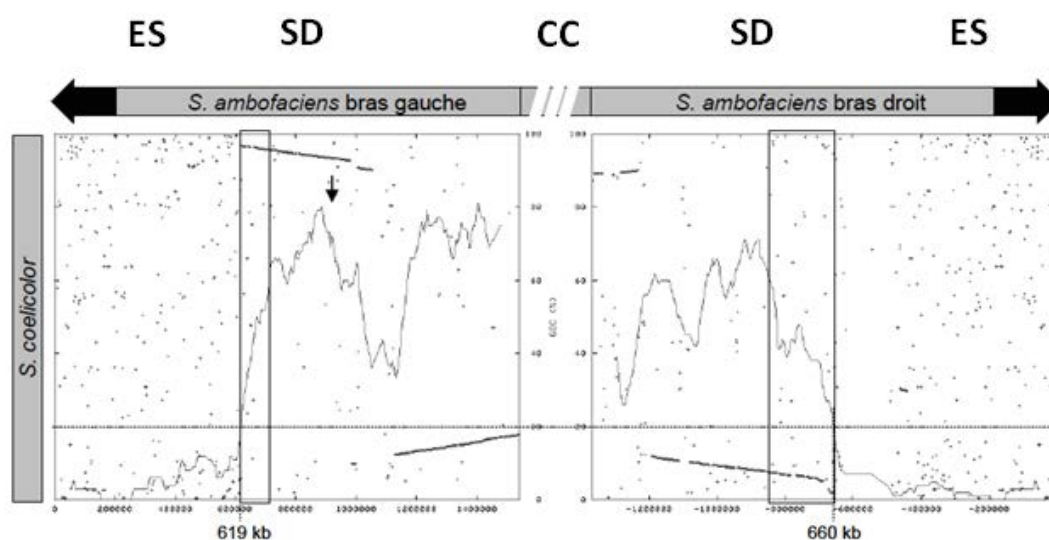


Figure 18. Profil de GOC le long des bras chromosomiques gauche et droit de *S. ambofaciens* comparé au génome de *S. coelicolor*. D'après Choulet *et al.* (2006).

La courbe du GOC est superposée au dot-plot. Un seuil minimal de GOC de 20% a été choisi pour délimiter les régions terminales spécifiques d'espèces. ES : extrémités spécifiques ; SD : régions de synténie dégénérée ; CC : région centrale conservée. Les régions de synténie dégénérée (entre 20% et 60% de GOC) sont encadrées.

1.4.4. Les recombinaisons chez *Streptomyces*

Les mécanismes de recombinaison restent peu étudiés chez *Streptomyces*, mais quelques résultats des analyses génétiques ont fait la preuve de la relation de ces mécanismes avec l'instabilité génétique de *Streptomyces*.

La recombinaison homologe paraît être très efficace chez *Streptomyces* (Wohlleben *et al.*, 1994). L'analyse MLSA (pour multilocus sequence analysis) a révélé la haute fréquence de la recombinaison homologe intraspécifique et interspécifique (Doroghazi and Buckley, 2010). Le gène essentiel de RH, *recA*, joue un rôle dans l'instabilité génomique chez *Streptomyces*. La diminution de l'activité de RecA provoque une augmentation importante (environs 70 fois) du niveau d'instabilité génomique chez *Streptomyces lividans*. La surexpression de *recA* et la surproduction de RecA sont corrélées dans un mutant où les événements

d'amplification ont lieu dans la région instable de *Streptomyces ambofaciens*. Elle a donc une fonction importante dans le maintien de l'intégrité du génome et a également été impliquée dans les événements d'amplification d'ADN (Aigle *et al.*, 1997; Volff and Altenbuchner, 1997).

En ce qui concerne la recombinaison illégitime, la comparaison de la séquence de jonction avec les séquences des bras chromosomiques gauche et droit de la souche sauvage de *S. avermitilis* a suggéré que la recombinaison illégitime se produit au sein d'une région avec microhomologies (Chen *et al.*, 2010). La circularisation du chromosome chez *S. griseus* et la génération de mutants qui possèdent un chromosome issu de la fusion de deux chromosomes chez *S. ambofaciens* impliquent la recombinaison illégitime (Inoue *et al.* 2003; Wenner *et al.* 2003).

2. Objectifs de la thèse

Le développement de la génomique comparée au sein des *Streptomyces* (Choulet *et al.*, 2006) et les études anciennes sur la plasticité du génome (Thibessard and Leblond, 2014) permettent de corréler les mécanismes de la recombinaison chromosomique, les phénomènes de transfert de gènes et l'organisation génétique remarquable de leur génome.

Les objectifs de mon travail de thèse ont donc focalisés sur l'exploration des mécanismes de réparation des cassures double brin. Pour cela les acteurs majeurs de la recombinaison homologue et illégitime (Non-Homologous End Joining) ont été recherchés dans les génomes et une approche de génétique fonctionnelle a été initiée sur les gènes identifiés.

Mes travaux de thèse sont donc organisés en deux grands chapîtres :

- (1) L'étude de la recombinaison homologue avec l'identification de l'acteur (AdnAB) de l'étape présynaptique chez *Streptomyces*.
- (2) L'identification et l'exploration fonctionnelle des homologues de Ku et LigD potentiellement impliqués dans le système NHEJ chez *S. ambofaciens*.

RÉSULTATS

3. Résultats

3.1. La recombinaison homologue

Comme mentionné dans l'introduction, la recombinaison homologue se compose de plusieurs étapes impliquant différentes protéines. La première étape, c'est-à-dire l'étape de modification des extrémités des DSB, est assurée par un complexe protéique tel que RecBCD chez *E. coli*, AddAB chez *B. subtilis* et AdnAB chez *M. tuberculosis*. Ces protéines sont essentielles à la réalisation de la recombinaison homologue. Mon travail a commencé par l'identification d'homologues de ces complexes susceptibles d'assurer cette étape pré-synaptique chez les *Streptomyces*.

3.1.1. Les gènes *adnAB* dans les génomes de *Streptomyces*

Les analyses *in silico* de Rocha *et al.* (2005) avaient suggéré que *S. avermitilis* et *S. coelicolor* ne possédaient pas les homologues de RecB, de RecC ni de AddAB. Seul un homologue de RecD avait pu être détecté. De plus, les génomes de ces deux *Streptomyces* sont dépourvus d'homologue de RecJ, une nucléase intervenant dans la voie RecFOR lors de la réparation de DSB. Depuis 2005 les bases de données se sont enrichies et le complexe AdnAB de *Mycobacterium* a été caractérisé (Sinha *et al.*, 2009) ; nous avons donc entrepris de rechercher les acteurs potentiels de l'étape pré-synaptique au sein de ce genre par une identification d'homologues de RecBCD, AddAB et AdnAB dans 20 génomes de *Streptomyces* désormais disponibles.

Premièrement, un blastP a été réalisé à l'aide des séquences protéiques de RecB, RecC et RecD d'*E. coli*. Aucun homologue de RecB ni de RecC n'a été détecté dans les génomes de *Streptomyces*. En revanche, un homologue de RecD a été détecté dans chaque génome avec une identité protéique de l'ordre de 30% portant sur la région 152-608 de cette protéine de 608 acides aminés. Un résultat similaire est obtenu en

utilisant les séquences protéiques de Ro01837, Ro01838 et Ro01836, les homologues respectifs de RecB, RecC et RecD de *Rhodococcus* sp. RHA1, bactérie phylogénétiquement proche des *Streptomyces* : aucun homologue de Ro01837 ni de Ro01838 n'est détecté alors qu'un homologue de Ro01836 est présent avec une identité de l'ordre de 30% sur une portion recouvrant environ 70% de ces protéines. Ainsi, cette analyse confirme que le système RecBCD n'est pas présent chez *Streptomyces*.

Ensuite, des homologues des séquences protéiques d'AddAB de *B. subtilis* (AddA : BSU10630 ; AddB : BSU10620) ont été recherchés. Aucun résultat significatif n'a été obtenu pour AddB. Pour AddA, une faible homologie (25% d'identité protéique) est décelée avec la protéine PcrA (ATP-dependent DNA helicase II) sur la moitié de la protéine. Ainsi, il semble que la voie AddAB ne soit pas être présente chez *Streptomyces*.

Enfin, des homologues d'AdnAB de *M. tuberculosis* ont été détectés dans tous les génomes entièrement séquencés de *Streptomyces* (tableau 2). Ces homologues s'alignent avec AdnA ou AdnB de *M. tuberculosis* selon deux blocs, l'un dans la région N-terminale, l'autre dans la région C-terminale, avec une identité protéique variant entre 32% et 44%. Ces deux blocs sont séparés par une région variable en taille et en séquence (figure 19). De plus, dans la quasi-totalité des génomes de *Streptomyces*, les gènes codant les homologues d'AdnA et AdnB sont co-localisés et orientés dans la même direction. Deux exceptions sont à noter : *Streptomyces cattleya* et *Streptomyces venezuelae*. Chez le premier, un gène probable de fonction inconnue et mesurant 540 nucléotides se situe entre *adnA* et *adnB* sur le brin complémentaire. Chez le second, un gène probable de 834 nucléotides est détecté entre *adnA* et *adnB*, dans le même sens de transcription, et codant une lipoprotéine putative.

G énome	Nom du locus AdnA	Identité (aa)*	Nom du locus AdnB	Identité (aa)*
<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	SAV_3077	35%	SAV_3076	42% (N-term) 44% (C-term)
<i>Streptomyces bingchenggensis</i> BCW-1	SBI_04047	38% (N-term) 34% (C-term)	SBI_04046	41% (N-term) 43% (C-term)
<i>Streptomyces cattleya</i> NRRL 8057 = DSM 46488	SCAT_4044	36%	SCAT_4047	40%
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	SCO5183	40% (N-term) 33% (C-term)	SCO5184	41% (N-term) 39% (C-term)
<i>Streptomyces flavogriseus</i> ATCC 33331	Sfla_2108	39% (N-term) 34% (C-term)	Sfla_2107	42% (N-term) 42% (C-term)
<i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> NBRC 13350	SGR_2342	33%	SGR_2341	41% (N-term) 42% (C-term)
<i>Streptomyces scabiei</i> 87.22	SCAB_30771	39% (N-term) 33% (C-term)	SCAB_30761	41% (N-term) 40% (C-term)
<i>Streptomyces</i> sp. SirexAA-E	SACTE_4413	35%	SACTE_4414	42% (N-term) 42% (C-term)
<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu 4113	Strvi_1501	36%	Strvi_1502	42% (N-term) 41% (C-term)
<i>Streptomyces clavuligerus</i> ATCC 27064	SCLAV_4047	38% (N-term) 32% (C-term)	SCLAV_4048	42% (N-term) 41% (C-term)
<i>Streptomyces lividans</i> TK24	SLI_5469	40% (N-term) 33% (C-term)	SLI_5470	41% (N-term) 39% (C-term)
<i>Streptomyces davawensis</i> JMC 4913	BN159_3205	35%	BN159_3204	42% (N-term) 42% (C-term)
<i>Streptomyces collinus</i> Tu 365	B446_24410	40% (N-term) 34% (C-term)	B446_24415	42% (N-term) 42% (C-term)
<i>Streptomyces hygrosopicus</i> subsp. <i>Jinggangensis</i> TL01	SHJGH_6050	40% (N-term) 33% (C-term)	SHJGH_6052	43% (N-term) 44% (C-term)
<i>Streptomyces hygrosopicus</i> subsp. <i>Jinggangensis</i> 5008	SHJG_6289	40% (N-term) 33% (C-term)	SHJG_6291	43% (N-term) 44% (C-term)
<i>Streptomyces fulvissimus</i> DSM 40593	SFUL_4994	36%	SFUL_4995	42% (N-term) 42% (C-term)
<i>Streptomyces albus</i> J1074	XNR_1620	34%	XNR_1619	41% (N-term) 38% (C-term)
<i>Streptomyces</i> sp. PAMC26508	F750_4709	39% (N-term) 34% (C-term)	F750_4710	42% (N-term) 42% (C-term)
<i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 10712	SVEN_4833	35%	SVEN_4835	42% (CDS tronquée – 919 aa seulement)
<i>Streptomyces rapamycinicus</i> NRRL 5491	M271_51085 ^a	40% (N-term) 33% (C-term)	M271_18000	42% (N-term) 39% (C-term)
<i>Saccharopolyspora erythrea</i> NRRL2338	SACE_1077	48%	SACE_1078	51%
<i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4	RER_22180	48%	RER_22190	55%
<i>Frankia</i> sp. CcI3	Francci3_3800	35%	Francci3_3799	42%

 Tableau 2. AdnAB dans les génomes de *Streptomyces*

* Seuls les alignements avec une e-value inférieure à 10^{-20} pour AdnA et 10^{-40} pour AdnB sont rapportés.

^a une séquence indéterminée dans la phase de lecture a empêché l'identification d'*adnA* de *S. rapamycinicus*, mais le gène semble présent en amont d'*adnB*. Les pourcentages d'identité ont été obtenus par un alignement (BlastX) de cette séquence nucléotidique avec AdnA de *M. tuberculosis*.

En alignant les séquences protéiques d'AdnA et AdnB des 20 espèces de *Streptomyces*, la conservation des motifs hélicase (Q, I, Ia, II-VI) définis par Gorbalenya and Koonin (1993) et Tanner *et al.* (2003) est mise en évidence (figure 19, 20). De plus, dans la région C-terminale d'AdnA et d'AdnB, les trois résidus qui sont essentiels pour l'activité de nucléase, d'après Yu *et al.* (1998) et Wang *et al.* (2000), sont eux aussi conservés (figure 19 et 20). La présence de ces motifs suggère que les homologues d'AdnAB de *Streptomyces* possèdent potentiellement les activités d'hélicase et nucléase.

Etant donné que les systèmes RecBCD, AddAB et RecFOR sont absents chez les *Streptomyces*, le système AdnAB semble être le seul candidat hélicase-nucléase susceptible d'assurer la première étape de la recombinaison homologue chez cet organisme.

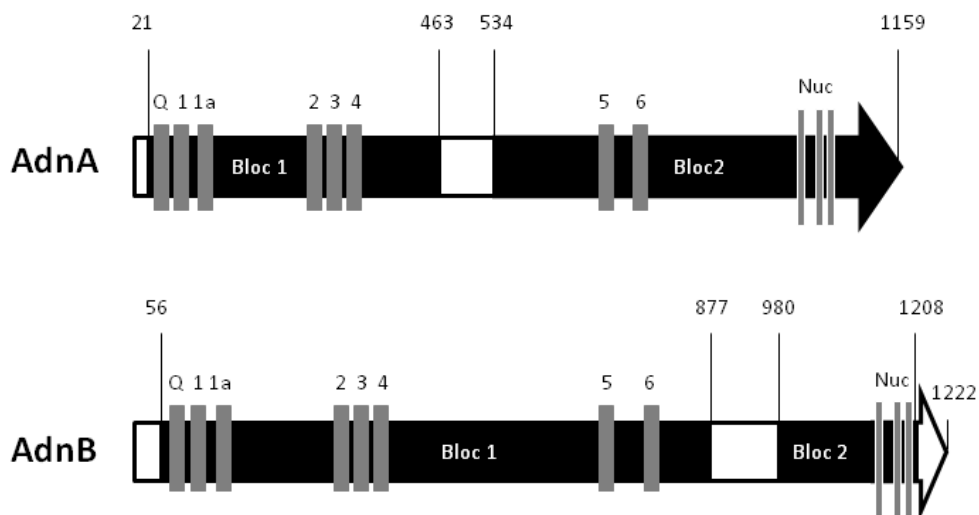


Figure 19. Organisation des gènes *adnAB* de *S. coelicolor*

Les gènes *adnA* (SC05183) et *adnB* (SC05184) sont représentés par deux flèches. Les parties noires et blanches dans les flèches signifient les régions conservées et les régions variables respectivement. Leurs positions relatives par rapport au codon start du gène sont indiquées. Les barres grises numérotées représentent les motifs hélicase (Q, I, Ia, II-VI). Les sites essentiels pour l'activité nucléase sont indiqués par les barres marquées « Nuc ».

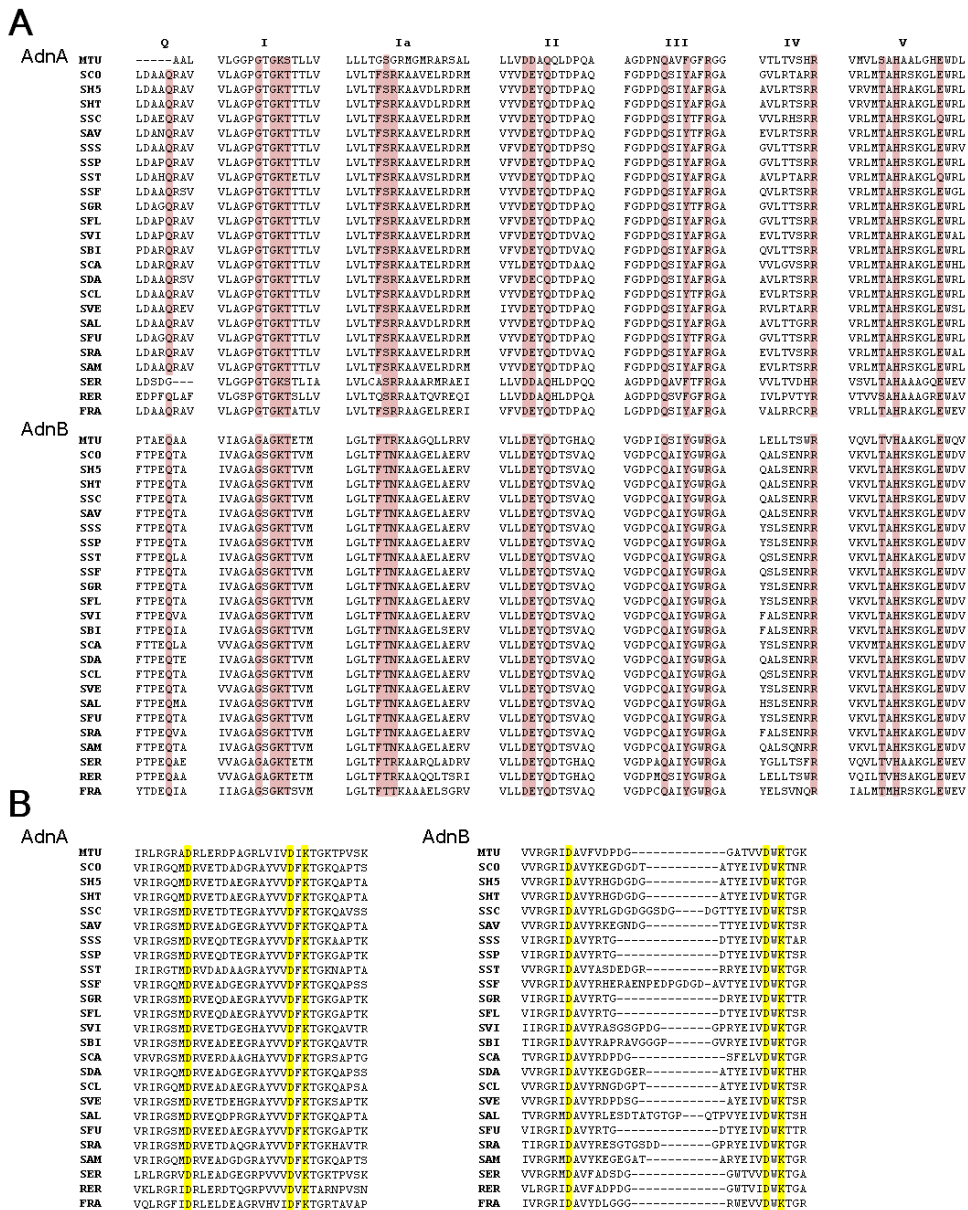


Figure 20. Motifs hélicase et nucléase

Les séquences des protéines homologues d'AdnA et AdnB des 20 espèces de *Streptomyces*, *Saccharopolyspora erythraea*, *Rhodococcus erythropolis* et *Frankia* sp. Ccl3 ont été alignées. Au sein des séquences des motifs hélicase (Q, I, Ia, II-VI) les acides aminés impliqués directement dans l'activité hélicase sont indiqués sur fond rouge dans (A). Les trois acides aminés impliqués dans le site actif de l'activité nucléase sont en jaune dans (B).

3.1.2. *adnAB* est essentiel chez les *Streptomyces*

Si AdnAB est le seul complexe hélicase-nucléase de RH chez *Streptomyces*, il était possible qu'il soit nécessaire à la croissance cellulaire étant donné l'importance de la RH dans les processus cellulaires fondamentaux (la réplication du chromosome, la ségrégation, le maintien de l'intégrité du chromosome, etc.). En effet, chez les bactéries, l'inactivation des systèmes de modification des extrémités des DSB a un impact important sur la viabilité cellulaire. Chez *E. coli*, le mutant $\Delta recBC$ ne présente que 30% de survie (Capaldo *et al.*, 1974) ; chez *B. subtilis*, le double mutant $addAB\Delta recJ$ présente une viabilité cellulaire réduite d'un facteur 10 par rapport à celle de la souche sauvage (Sanchez *et al.*, 2006) ; chez *Acinetobacter baylyi*, le mutant $\Delta recBCD\Delta recJ$ n'est pas viable. Qu'en est-il chez *Streptomyces* : les homologues d'AdnAB seraient-ils essentiels à la viabilité ?

Afin d'aborder cette question, nous avons envisagé de déléter le locus *adnAB* de *S. ambofaciens* ATCC23877. Pour ce faire, le plasmide pNSV005 a été construit par clonage des régions amont (1,5 kb) et aval (1,8 kb) du locus *adnAB* de part et d'autre de la cassette *att3aac* conférant la résistance à l'apramycine au sein du vecteur pWED2 (Karray *et al.*, 2007). Les souches et les plasmides utilisés sont indiqués dans le tableau 6.

Le cosmide pNSV005 a été d'abord introduit dans la souche d'*E. coli* ET12567/pUZ8002 par électroporation. Cette souche ET12567/pUZ8002 a la capacité, par la présence du plasmide pUZ8002, de mobiliser en *trans* un plasmide porteur d'une origine de transfert RK2. Ainsi, pNSV005 a été introduit par conjugaison inter-générique dans la souche sauvage de *S. ambofaciens* ATCC23877.

Après deux cycles de croissance des exconjugants ainsi obtenus sur un milieu additionné d'apramycine, nous avons tenté de sélectionner les clones résistants à

l'apramycine et sensibles à la puromycine. Ces clones [Apra^R Puro^S] devraient avoir subi un double événement de recombinaison homologue en amont et en aval du locus *adnAB*, menant au remplacement de ce locus par la cassette de résistance à l'apramycine (figure 21). Cette sélection pour le phénotype [Apra^R Puro^S] est réalisée par réplique sur velours des colonies de la boîte de SFM additionnée d'apramycine sur boîte de SFM additionnée de puromycine. Cependant, aucun clone [Apra^R Puro^S] n'a été obtenu sur plus de 110 clones testés. Tous les clones résistants à l'apramycine sont également résistants à la puromycine, suggérant qu'ils n'avaient subi qu'un unique événement de crossing-over (dans la région U ou dans la région D) menant à l'intégration du vecteur pNSV005, mais pas à la délétion du locus *adnAB*.

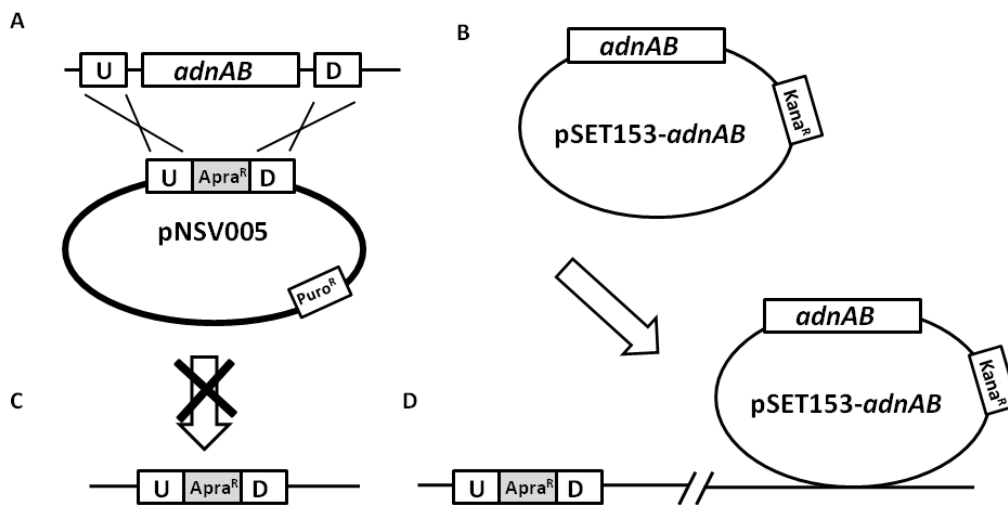


Figure 21. Schéma général de la stratégie pour la délétion du locus *adnAB* du chromosome.

Le mutant délété du locus *adnAB* (C) par deux événements de crossing-over entre le cosmide pNSV005 et le chromosome (A) n'a pas été obtenu. Quand le plasmide de complémentation pSET153-*adnAB* (B) est introduit dans la cellule, les clones [Apra^R Kana^R Puro^S] représentant le mutant délété du locus *adnAB* dans le chromosome (D) ont été obtenus. U et D représentent les régions d'ADN en amont et en aval du locus *adnAB* respectivement.

Une analyse par PCR de ces clones a permis de déterminer si cet unique crossing-over a eu lieu dans la région U ou dans la région D. Sur 12 clones analysés

de la sorte, 7 se révèlent avoir subi un crossing-over dans la région U et 5 dans la région D. Ainsi, individuellement, ces deux événements sont possibles ; l'incapacité à obtenir des événements de double crossing-over serait donc la conséquence du caractère essentiel du locus *adnAB* pour la croissance de *S. ambofaciens*.

Afin de confirmer le caractère essentiel du locus *adnAB*, la possibilité de déléter ce locus en présence d'une copie ectopique a été testée. A cette fin, le plasmide pSET153-*adnAB* a été construit. Cette construction a nécessité plusieurs étapes :

- le clonage d'un fragment *NcoI* de 11,4kb contenant le locus *adnAB* et provenant du BAC BAB15ZE8 dans le vecteur pSL1180
- le clonage d'un fragment *XbaI-EcoRI* de 11,4kb contenant le locus *adnAB* issu du vecteur précité dans le vecteur intégratif pSET152 pour générer le plasmide pSET152-*adnAB*
- le remplacement de la résistance à l'apramycine du vecteur pSET152-*adnAB* par le gène *neo* conférant la résistance à la kanamycine. Cette dernière modification a été mise en œuvre par PCR-targeting et engendre le vecteur pSET153-*adnAB*. Cette même modification a été réalisée en parallèle sur pSET152 pour générer pSET153.

La réalisation d'un clonage intermédiaire dans pSL1180 est justifiée par une incompatibilité entre les sites de restriction du BAC BAB15ZE8 et pSET152, et le remplacement du marqueur de résistance vise à pouvoir sélectionner cette construction indépendamment de la cassette de mutagénèse.

Le plasmide pSET153-*adnAB* ainsi obtenu a été introduit par conjugaison intergénérique dans 3 clones de *S. ambofaciens* ayant subi l'insertion du cosmide pNSV005 par un simple crossing-over dans la région U (engendrant les clones Sam-U-pNSV005) ainsi que dans 3 clones ayant subi l'intégration de pNSV005 par

un simple crossing-over en aval dans la région D (engendrant les clones Sam-D-pNSV005). L'ajout de kanamycine permet de sélectionner l'intégration de ce plasmide dans le chromosome de *S. ambofaciens*, intégration qui se fait par recombinaison site-spécifique au site d'intégration (*attB*) du phage ϕ C31, localisé dans la région centrale du chromosome, à plus d'1 Mb du locus *adnAB*. En parallèle, le plasmide vide pSET153 a également été introduit dans les deux mêmes séries de 3 clones.

Après deux cycles de croissance sur milieu SFM additionné de kanamycine, les spores de ces exconjugants ont été étalées sur boîtes SFM additionnées d'apramycine. Puis, les colonies obtenues ont été répliquées sur boîtes SFM additionnées de puromycine, permettant de visualiser, si ils existent, des clones [puro^S], c'est-à-dire ceux qui ont subi le second crossing-over conduisant à la délétion du locus *adnAB*. Il s'avère que :

- dans la descendance des clones présentant une copie ectopique du locus *adnAB* (portant pSET153-*adnAB*), environ 30% de colonies résistantes à l'apramycine étaient sensibles à la puromycine
- tandis qu'aucun clone sensible à la puromycine n'a pu être observé quand le plasmide pSET153 était intégré dans le chromosome (tableau 3).

Le premier point révèle que la délétion d'*adnAB* est réalisable. Le fait que cette délétion ne s'opère qu'en présence d'une copie ectopique démontre une contrainte fonctionnelle, et donc l'essentialité de ce locus *adnAB* pour la croissance de *S. ambofaciens*.

Chez *M. tuberculosis*, les gènes *adnA* et *adnB* sont présumés constituer un opéron (Sinha *et al.*, 2009). Dans presque tous les génomes de *Streptomyces* séquencés, *adnA* et *adnB* sont également co-localisés et transcrits dans le même sens. Afin de

tester si *adnA* et *adnB* de *S. ambofaciens* constituent un opéron, une PCR sur ADNc a été réalisée avec des amorces ciblant la région intergénique entre *adnA* et *adnB*. Les ADNc ont été préparés à partir de culture de la souche sauvage ATCC23877 en milieu HT liquide, en absence ou en présence de la MMC (1 µg/ml). Comme le montre la figure 22, aucun amplifiat n'a été détecté que ce soit en présence ou en absence de MMC, alors que dans ces mêmes conditions, une PCR ciblant la région codante d'*AdnA* génère un amplifiat décelable. Ainsi, chez *S. ambofaciens*, *adnA* et *adnB* ne sont pas co-transcrits et ne constituent pas un opéron. Le caractère inductible de la transcription de ce locus sera discuté ultérieurement (paragraphe 3.1.3).

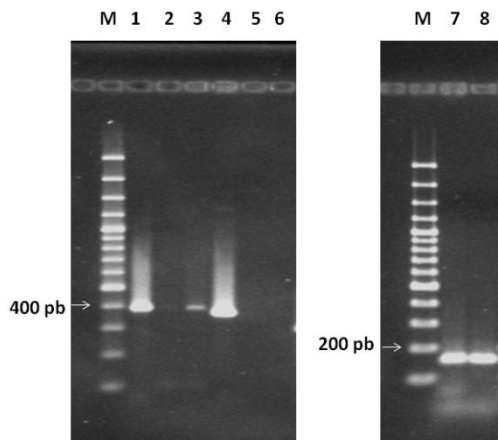
Souche	Fréquence de la délétion du locus <i>adnAB</i> *
Sam-U-pNSV005 + pSET153	0/386 (< 0,26%)
Sam-D-pNSV005 + pSET153	0/366 (< 0,27%)
Sam-U-pNSV005 + pSET153- <i>adnAB</i>	420/1314 (32%)
Sam-D-pNSV005 + pSET153- <i>adnAB</i>	464/1472 (31,5%)

Tableau 3. Fréquences de délétion du locus *adnAB*.

* La fréquence d'apparition de colonies [Apra^R Puro^S] au sein des [Apra^R]. P-value<0.001

Ce résultat a soulevé une question : la mort cellulaire de *S. ambofaciens* associée à la délétion du locus *adnAB* résulte-t-elle de la délétion d'*adnA*, de la délétion d'*adnB* ou bien chacun de ces deux gènes est-il essentiel ? Dans le but de répondre à cette question, une délétion indépendante des gènes *adnA* et *adnB* de *S. ambofaciens* a été entreprise.

Figure 22. Absence de co-transcription d'*adnA* et *adnB*.



Résultat de la migration électrophorétique des amplifiats obtenus par RT-PCR effectuée sur les ARN totaux extraits de *S. ambofaciens* exposé (piste 3 et 6) ou non (piste 2 et 5) à la MMC 1µg/ml. En témoin, l'amplifiat obtenu par une PCR sur l'ADN génomique de *S. ambofaciens* a été déposé (piste 1 et 4). L'amplification a ciblé la région en amont d'*adnA* (piste 1,2 et 3), la région intergénique entre *adnA* et *adnB* (piste 4,5 et 6) et une région interne du gène *adnA* (piste 7 et 8). Chacune de ces PCR a compté 40 cycles d'amplification.

Pour ce faire, le BAC BAB15ZE8 portant les gènes *adnA* et *adnB* a été muté pour l'un ou l'autre des gènes par PCR-targeting. Pour cela, le BAC BAB15ZE8 a d'abord été introduit chez *E. coli* DY330 qui possède le système λ RED (*gam*, *bet*, *exo*) favorisant la recombinaison homologue avec l'ADN linéaire. Puis, une amplification par PCR a été réalisée sur une matrice : le plasmide pSMP88T dérivant de la cassette de mutagenèse *att3 Ω aac+* (Raynal *et al.*, 2006) au sein de laquelle une origine de transfert a été ajoutée (Chipot, 2007). Les amorces utilisées au cours de cette amplification ont été dessinées avec des extensions en 5' correspondant aux régions flanquant *adnA* ou *adnB*. Les amplifiats ainsi obtenus ont été introduits indépendamment dans la souche DY330 portant le BAC BAB15ZE8 par transformation. Une sélection des transformants sur apramycine permet de sélectionner les BAC dérivés de BAB15ZE8 mutés pour *adnA* ou *adnB*.

Ces BAC recombinants ayant également acquis la capacité d'être conjugatifs grâce à l'ajout de l'origine de transfert au sein de la cassette, ils ont ensuite été introduits dans un contexte *S. ambofaciens* complémenté ou non par une copie ectopique du locus *adnAB*.

A l'image de la tentative de délétion du locus *adnAB*, la délétion des gènes *adnA* et *adnB* n'est observée que dans un contexte complémenté par une copie ectopique du locus. Ce résultat met en évidence que les gènes *adnA* et *adnB* sont tous les deux essentiels pour *S. ambofaciens*.

Une expérience similaire a été réalisée chez *S. coelicolor* A3(2). La mutagenèse est cette fois-ci réalisée à l'aide de cosmides interrompus par le transposon Tn5062 au sein du gène *adnA* ou *adnB* en position 311 pb ou 661 pb à partir de codon start, respectivement. Ces cosmides ont été fournis par Pr. Paul Dyson, University of Swansea (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>). Ces cosmides ont été introduits dans la souche d'*E. coli* ET12567/pUZ8002, à partir de laquelle ils ont été transférés par conjugaison intergénérique dans la souche sauvage de *S. coelicolor*. Au total, 6 clones ayant intégré le cosmide portant l'interruption dans *adnA* et 6 clones ayant intégré le cosmide portant l'interruption dans *adnB* par simple crossing-over ont été sélectionnés. Leur descendance a été analysée afin de déterminer le profil de résistance : les clones [Kan^S Apra^R], c'est-à-dire ceux présentant le transposon (porteur du gène de résistance à l'apramycine) mais dépourvus des séquences cosmidiennes (portant le gène de résistance à la kanamycine) ont été recherchés. En effet, ils correspondraient à des clones ayant muté pour *adnA* ou *adnB*. En cumulant les effectifs obtenus pour l'ensemble des 6 clones, il s'est avéré que :

- pour la recherche de mutants *adnA*, aucun clone [Kan^S Apra^R] n'a été observé parmi les 635 [Apra^R] testés,
- et pour la recherche de mutant *adnB*, aucun clone [Kan^S Apra^R] n'a été observé parmi les 942 [Apra^R] testés.

Ce résultat confirme l'essentialité d'*adnA* et d'*adnB* et permet d'élargir cette caractéristique à une autre espèce de *Streptomyces*, voire à l'ensemble du genre.

3.1.3. *adnA* et *adnB* de *Streptomyces* sont inductibles par les dommages à l'ADN

Les complexes hélicase-nucléase du mécanisme de RH (RecBCD, AddAB et AdnAB) ont été impliqués dans la réparation de l'ADN chez tous les organismes. L'expression de ces gènes est souvent influencée par la présence de dommages dans l'ADN. Par exemple, l'expression d'*addAB* de *Coxiella burnetii* et d'*adnAB* de *M. tuberculosis* est induite par la MMC (Mertens *et al.*, 2008; Rand *et al.*, 2003). Toutefois, le caractère inductible n'est pas une généralité : *recBCD* d'*E. coli* n'est pas inductible par les dommages à l'ADN. Nous avons donc testé l'hypothèse de l'inductibilité d'*adnAB* chez les *Streptomyces*.

Une étude réalisée chez *M. tuberculosis* a mis en évidence que la majorité des gènes induits par des dommages à l'ADN, l'est par un mécanisme indépendant de RecA/LexA (Rand *et al.*, 2003). C'est le cas notamment d'*adnA* et d'*adnB*. Chez ce même organisme, l'analyse des régions promotrices de 89 gènes inductibles par les dommages à l'ADN indépendamment de RecA/LexA a permis de mettre en évidence un motif promoteur (tTGTCRgtg-8nt-TAnnnT) en amont de 47 d'entre eux (Gamulin *et al.*, 2004). Malgré l'absence d'*adnAB* parmi cet ensemble, nous avons identifié une séquence proche du consensus de ce motif juste en amont des codons d'initiation des deux séquences codantes de ce locus. Un motif approchant ce consensus peut également être décelé dans la région promotrice des gènes *adnA* et/ou *adnB* de différentes espèces de *Streptomyces* ainsi que d'autres espèces actinomycétales phylogénétiquement proches des *Streptomyces* comme *Rhodococcus erythropolis*, *Saccharopolyspora erythrea* et *Frankia sp.* (figure 23).

Il est à noter que, dans certains cas, le promoteur inductible putatif se situe juste 6 ou 7 pb en amont du codon initiateur de la traduction ; c'est le cas d'*adnB* des *Streptomyces*, *adnA* et *adnB* de *M. tuberculosis* et *adnA* de *Frankia*. Cette observation

suggère que ces transcrits pourraient être 'leaderless', c'est-à-dire qu'ils seraient dépourvus de séquence 5'UTR, le premier nucléotide du transcrit étant aussi le premier nucléotide du codon d'initiation de la traduction.

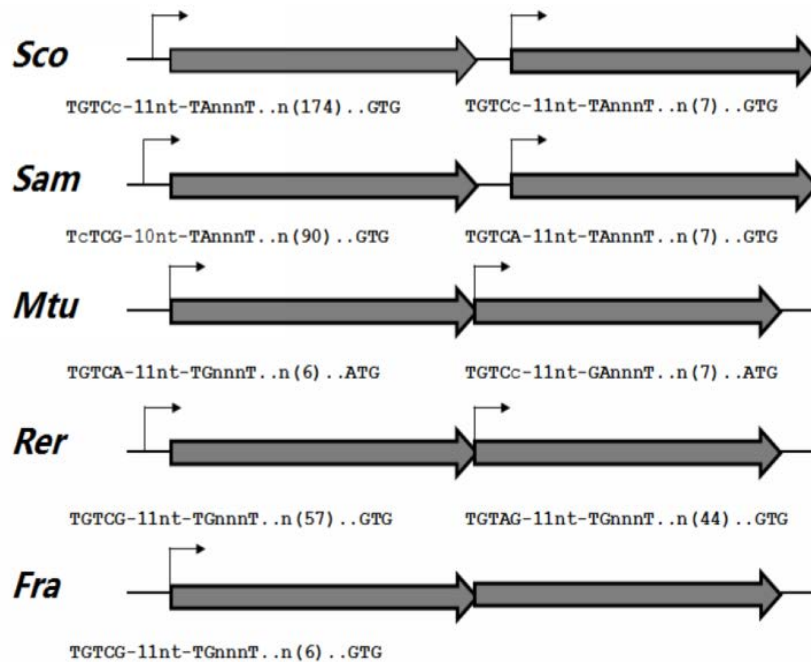


Figure 23. Organisation du locus *adnAB* chez les actinomycètes

Les promoteurs putatifs sont représentés par des flèches en amont des gènes *adnA* et *adnB* de *Sco* (*S. coelicolor*), *Sam* (*S. ambofaciens*), *Mtu* (*M. tuberculosis*), *Rer* (*Rhodococcus erythropolis*) et *Fra* (*Frankia sp.*). Les nucléotides répondant au consensus sont indiqués en majuscules et la distance entre le promoteur putatif et le codon d'initiation est indiquée entre parenthèses.

Afin d'aborder expérimentalement l'inductibilité d'*adnAB* de *Streptomyces*, des PCR semi-quantitatives et quantitatives ont été réalisées pour comparer le niveau d'expression des gènes *adnA* et *adnB* en présence ou non d'un agent génotoxique. Concrètement, des spores de *S. ambofaciens* ATCC23877 prégermées (Kieser *et al.*, 2000) servent à ensemercer du milieu HT liquide ($DO_{450nm} = 0,05$) puis cette culture est incubée à 30°C sous agitation. Quand la culture atteint une DO_{450nm} de 0,2, celle-ci est divisée en deux et l'un des aliquots est additionné de MMC en

concentration finale de 1 µg/ml. Après 30 minutes d'exposition, des extractions d'ARN ont été réalisées à partir des deux aliquots. Les ARN totaux des différents échantillons ont été traités par une étape de DNase suivie d'une étape de transcription inverse pour obtenir des ADNc, servant de matrice pour amplifier une région dans les gènes *adnA*, *adnB*, ainsi qu'*hrdB* et *recA* pour témoin. Le gène *hrdB* codant le facteur σ de ménage et constitutivement transcrit a servi de gène de référence et le gène *recA* a servi de contrôle positif d'inductibilité par les dommages à l'ADN puisqu'il a été démontré que sa transcription est induite en cas de stress génotoxique (Vierling *et al.*, 2000). Le résultat de PCR semi-quantitative a montré une augmentation de l'expression des gènes *adnA* et *adnB* en présence de MMC (figure 24). Une mesure de l'intensité de chaque amplifiat par le logiciel imageJ permet de préciser que cette augmentation atteint un facteur 4 pour *adnA* et 12 pour *adnB*. Par ailleurs, les résultats obtenus en PCR quantitative ont confirmé

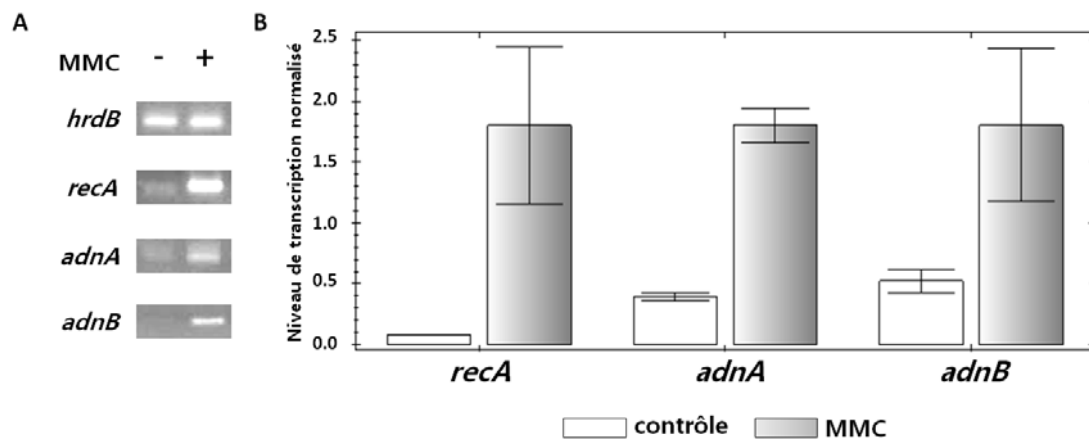


Figure 24. Induction des gènes *adnA* et *adnB* à la MMC

L'inductibilité des gènes *adnA* et *adnB* à la MMC a été analysée par PCR quantitative. Les cultures de *S. ambofaciens* ont été exposées ou non à la MMC (1 µg/ml) pendant 30 minutes. Les gènes *hrdB* et *recA* servent de gènes de référence et de contrôle d'inductibilité, respectivement. Le niveau d'expression de *hrdB* a été utilisé pour la normalisation. Le couple d'amorce et donc la région amplifiée pour le gène *adnB* sont différents entre (A) et (B). Ces expériences ont été réalisées en triplicat.

l'inductibilité d'*adnA* et *adnB* de *S. ambofaciens* par les dommages à l'ADN, avec un facteur 4 et 3 pour *adnA* et *adnB*, respectivement. Cette inductibilité d'*adnAB* de *Streptomyces* par la MMC renforce l'idée que ces gènes seraient impliqués dans un processus de réponse aux dommages à l'ADN, notamment la réparation de l'ADN.

3.1.4. *adnAB* de *S. ambofaciens* complémente la souche d'*E. coli* Δ *recB*

Chez *E. coli*, l'hélicase-nucléase assurant la première étape de la recombinaison homologue est RecBCD. RecB, une sous-unité du complexe RecBCD, est essentielle pour le fonctionnement de ce complexe dans le processus de RH. La délétion de *recB* conduit à une diminution de viabilité cellulaire jusqu'à 30% et à une diminution drastique de la survie en réponse aux agents génotoxiques par rapport à la souche sauvage (Kuzminov, 1999). Afin de déterminer si AdnAB de *Streptomyces* est un homologue fonctionnel de RecBCD d'*E. coli*, une trans-complémentation a été mise en œuvre par l'introduction des gènes *adnAB* de *S. ambofaciens* dans une souche d'*E. coli* mutée dans le gène *recB* (souche aimablement fournie par Dr. Bénédicte Michel). Le plasmide de complémentation pIJ6902-LCN-*adnAB* a été construit à cet effet. Sa construction a été réalisée par PCR-targeting : le vecteur pSET153-*adnAB* a été introduit dans la souche DY330, puis, un clone résultant de cette transformation a été transformé par un amplifiat correspondant au plasmide pIJ6902-LCN, linéarisé au niveau du promoteur pTipA. Le plasmide pIJ6902-LCN est un plasmide avec faible nombre de copies portant l'origine de répllication est celle du facteur F. Le bon déroulement de cette opération est vérifié après extraction d'ADN plasmidique par diverses restrictions enzymatiques. La souche mutante d'*E. coli* Δ *recB* et la souche sauvage ont été transformées par ce plasmide pour obtenir la souche complétementée Δ *recB*/LCN-*adnAB* et WT/LCN-*adnAB*. En parallèle, le plasmide pIJ6902-LCN a été également introduit dans ces souches d'*E. coli*, afin de produire les souches témoins nécessaires aux expériences ultérieures.

3.1.4.1. *adnAB* de *S. ambofaciens* augmente l'activité nucléase de la souche $\Delta recB$ d'*E. coli*

La composition en bases G et C du génome de *Streptomyces* est très déséquilibrée avec 72% de GC. Afin de tester si ces gènes sont en mesure d'être transcrits puis traduits chez *E. coli*, nous avons estimé l'activité nucléase d'extraits bruts exprimant ou non *adnAB*. L'activité nucléase de ces extraits bruts est évaluée par la mise en présence d'ADN linéaire (amplifiat de PCR de 3,7kb) comme substrat. Le mélange réactionnel contient par ailleurs du $MgCl_2$ et de l'ATP, facteurs essentiels à l'activité hélicase-nucléase de l'enzyme (Arnold and Kowalczykowski, 1998). Le mélange de réaction a été incubé à 37°C pendant 0h, 1,5h et 3h. Finalement, la quantité d'ADN dégradé en présence de l'extrait brut de la souche $\Delta recB/LCN-adnAB$ est significativement plus importante qu'en présence de l'extrait de $\Delta recB/LCN$. Ainsi, l'activité nucléase est accrue lorsqu'*adnAB* de *Streptomyces* est présent dans le mutant $\Delta recB$ (figure 25). Cela a confirmé qu'*adnAB* de *S. ambofaciens* était capable de s'exprimer chez *E. coli* et que l'activité codée est une activité nucléase. Il est à noter cependant que la dégradation de l'ADN par l'extrait de WT/LCN-*adnAB* est moins efficace que par l'extrait de WT/LCN, ce qui paraît contradictoire avec notre observation précédente. Toutefois, sachant que chez *E. coli*, la quantité de RecBCD est très finement régulée, et qu'un dérèglement à la hausse comme à la baisse a un impact négatif sur la survie de la cellule, il semble délicat d'interpréter le niveau global d'activité nucléase dans une cellule où RecBCD et AdnAB sont exprimées simultanément. Ces résultats ont été observés de façon reproductible au cours de 3 expériences indépendantes (avec des extraits bruts issus de 3 séries de cultures différentes), et pour deux clones différents de chaque génotype ($\Delta recB/LCN-adnAB$, $\Delta recB/LCN$, WT/LCN-*adnAB* et WT/LCN).

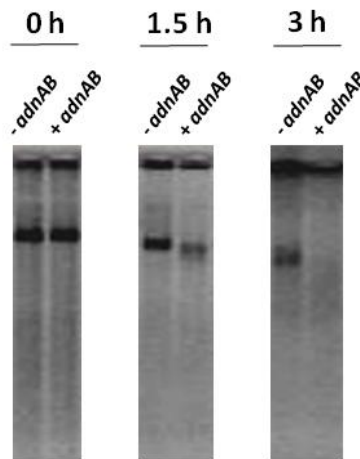


Figure 25. *adnAB* de *S. ambofaciens* restaure l'activité nucléase d'*E. coli* Δ *recB*

Après une culture sur la nuit en milieu LB liquide, les cellules sont reprises dans du tampon de lyse (1mM DTT, 1mM EDTA, 1mg/ml lysozyme et 0.05M Tris pH8), puis soniquées (3 cycles de 2 minutes, espacés de pause de 15 secondes). Suite à une centrifugation, les surnageants sont récupérés et constituent les extraits bruts qui sont ensuite dosés par la méthode Bradford. Ces extraits sont incubés en présence d'ADN linéaire, de $MgCl_2$ et d'ATP pendant 0h, 1,5h et 3h, avant que la réaction ne soit stoppée par l'ajout d'EDTA. La quantité d'ADN restant est visualisée par migration sur gel d'agarose. « -*adnAB* » et « +*adnAB* » représentent les extraits bruts des souches d'*E. coli* Δ *recB* portant le plasmide vide et le plasmide contenant le locus *adnAB* respectivement.

3.1.4.2. *adnAB* de *S. ambofaciens* restaure la viabilité et la résistance aux UV d'*E. coli* Δ *recB*

L'effet d'*adnAB* de *Streptomyces* sur la viabilité cellulaire du mutant d'*E. coli* Δ *recB* a été testé par la procédure suivante. Les cultures de la souche sauvage WT/LCN et des souches mutantes Δ *recB*/LCN et Δ *recB*/LCN-*adnAB* ont été incubées jusqu'à une DO_{600nm} d'environ 0,3 puis ont été étalées sur boîte LB par un enseigneur spiral (easySpiral® d'Interscience). La viabilité des cellules est estimée par le nombre d'UFC dénombrées par millilitre de culture rapporté à la DO_{600nm} . Cette valeur est rapportée à celle obtenue avec la souche témoin WT/LCN pour donner la viabilité cellulaire relative. Dans nos conditions, la survie de la souche Δ *recB*/LCN est environ 20 fois plus faible que celle de la souche sauvage. L'ajout d'une copie

ectopique d'*adnAB* complémente partiellement ce phénotype, augmentant la survie de la souche $\Delta recB$ d'un facteur 10 environ (figure 26).

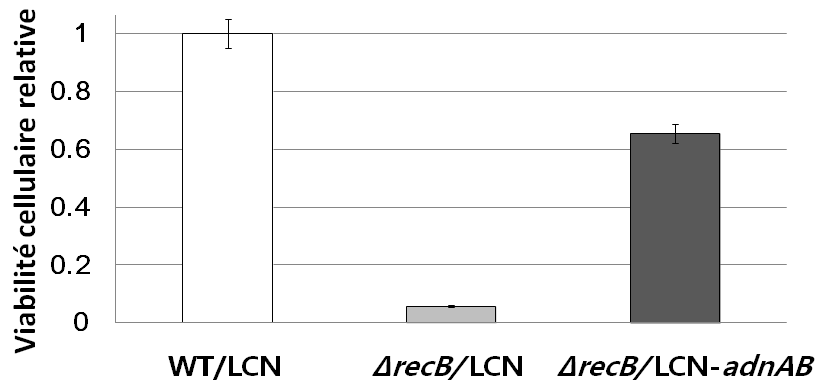


Figure 26. *adnAB* de *S. ambofaciens* restaure la viabilité d'*E. coli* $\Delta recB$

La viabilité cellulaire de la souche sauvage d'*E. coli* portant le plasmide pIJ6902-LCN (WT/LCN) et des souches mutantes d'*E. coli* $\Delta recB$ portant pIJ6902-LCN ($\Delta recB$ /LCN) et pIJ6902-LCN-*adnAB* ($\Delta recB$ /LCN-*adnAB*) exprimée en UFC/ml divisé par la DO_{600nm} .

Nous avons également cherché à évaluer l'effet d'*adnAB* de *Streptomyces* sur la réparation de l'ADN de la souche d'*E. coli* mutante $\Delta recB$. Dans cette expérience, les cultures des souches WT/LCN, $\Delta recB$ /LCN et $\Delta recB$ /LCN-*adnAB*, incubées jusqu'à une DO_{600nm} d'environ 0,3 ont été étalées sur boîte LB puis exposées à des rayonnements UV de 0, 10 J/m² et 30 J/m². Les boîtes ont été placées à l'obscurité afin d'éviter la réparation des dommages par photoréactivation (Harold and Hopwood, 1970). Il apparaît que la survie à ce traitement est meilleure pour la souche complémentée ($\Delta recB$ /LCN-*adnAB*) que pour la souche non complémentée ($\Delta recB$ /LCN), avec une augmentation d'un facteur 60 et 100 aux doses 10 J/m² et 30 J/m² respectivement (figure 27). Le locus *adnAB* de *Streptomyces* est donc en mesure de restaurer le taux de survie d'une souche d'*E. coli* déficiente pour RecBCD.

Ces résultats suggèrent qu'AdnAB de *Streptomyces* est un homologue fonctionnel de RecBCD d'*E.coli*.

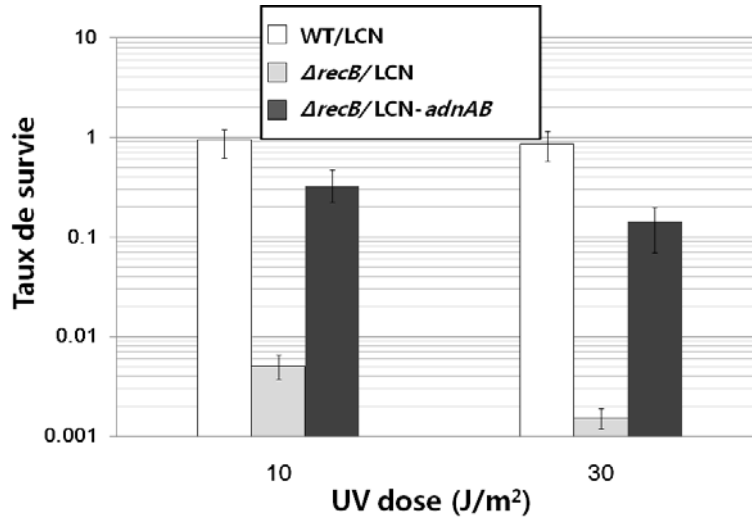


Figure 27. *adnAB* de *S. ambofaciens* restaure le taux de survie d'*E. coli* $\Delta recB$ à UV

La souche sauvage d'*E. coli* portant le plasmide pIJ6902-LCN (WT/LCN) et les souches mutantes d'*E. coli* $\Delta recB$ portant pIJ6902-LCN ($\Delta recB$ /LCN) et pIJ6902-LCN-*adnAB* ($\Delta recB$ /LCN-*adnAB*) ont été étalées et puis exposées à des doses d'UV de 0, 10 J/m² et 30 J/m². Leur taux de survie est calculé par le rapport entre le nombre d'UFC après exposition et le nombre d'UFC sans exposition. Ces expériences ont été réalisées en triplicat.

3.1.5. L'ajout d'une seconde copie d'*adnAB* affecte le phénotype de *Streptomyces*

3.1.5.1. Niveau de transcription d'*adnAB* chez *Streptomyces* présentant deux copies du locus

Afin de mieux comprendre le rôle d'*adnAB* chez *Streptomyces*, et à défaut de disposer d'un mutant déficient pour ces gènes, nous avons entrepris de comparer le phénotype de souches de *Streptomyces* qui portent une seconde copie du locus *adnAB* au phénotype des souches isogéniques sauvages. Pour obtenir ces souches, le plasmide pSET153-*adnAB* et le plasmide pSET153 ont été introduits dans *S. ambofaciens* DSM40697 et *S. coelicolor* A3(2). Au préalable, une estimation de la

quantité de transcrits *adnAB* a été réalisée afin de s'assurer que l'ajout d'une seconde copie du locus avait bien un impact positif sur son niveau d'expression. Cette estimation a été faite par PCR semi-quantitative et quantitative, en utilisant comme matrice des ADNc générés à partir d'ARN totaux extraits de cultures des souches de *S. ambofaciens* portant pSET153 ou pSET153-*adnAB* (figure 28). Ces cultures ont été réalisées en milieu HT liquideensemencé à partir de spores prégermées et incubées à 30°C pendant 45h. Les résultats obtenus en PCR quantitative comme en PCR semi-quantitative révèlent un taux de transcrit supérieur en présence de deux copies du locus comparativement à ce que l'on obtient en présence d'une seule copie du locus (référence). Seuls les résultats de PCR quantitative sont présentés ici, pour *adnA* et pour *adnB*.

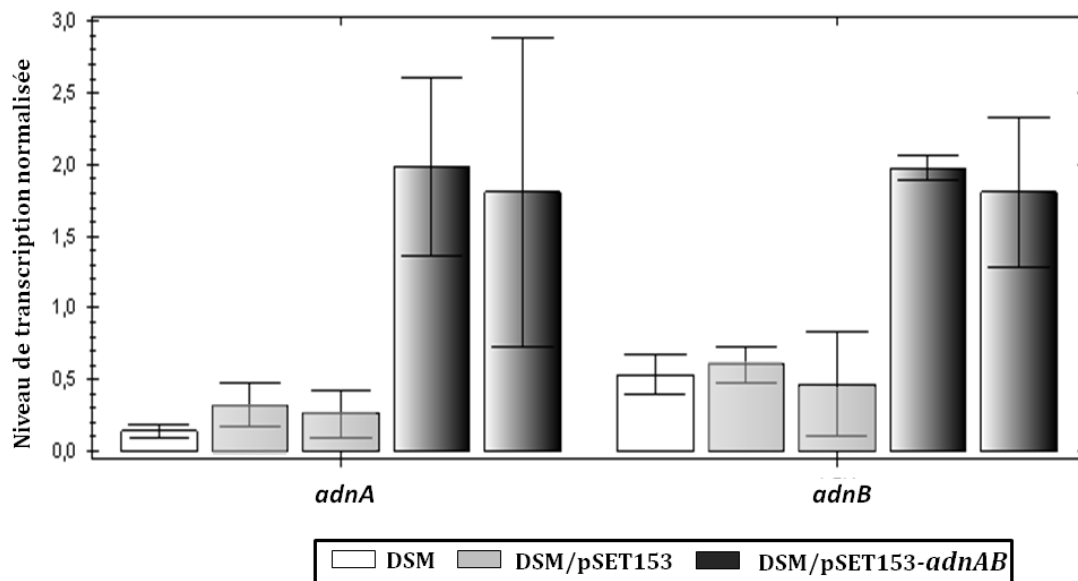


Figure 28. Niveaux d'expression d'*adnA* et *adnB* en présence d'une ou deux copies du locus

Les niveaux d'expression des gènes *adnA* et *adnB* de la souche sauvage de *S. ambofaciens* DSM40697, et de cette même souche contenant le plasmide pSET153 (DSM/pSET153) ou le plasmide pSET153-*adnAB* (DSM/pSET153-*adnAB*) ont été mesurés par PCR quantitative. Deux clones indépendants de DSM/pSET153 et DSM/pSET153-*adnAB* ont été analysés. L'étape de retrotranscription a été réalisée une fois et l'étape de PCR quantitative a été réalisée en triplicat.

La comparaison des souches de *Streptomyces* exprimant *adnAB* à différents niveaux a mis en évidence un certain nombre de différences phénotypiques.

3.1.5.2. La croissance

Quand les souches de *S. coelicolor* portant une ou deux copies d'*adnAB* sont mises en culture solide sur milieu SFM, la souche présentant deux copies d'*adnAB* semble avoir une croissance retardée comparativement à la souche ne présentant qu'une copie du locus (souche de référence) (figure 29). Alors que des colonies étaient déjà visibles à deux jours de croissance pour la souche de référence, aucune croissance n'était visible pour la souche *S. coelicolor* présentant deux copies d'*adnAB*. Au troisième jour, des colonies de la souche SCO/*adnAB* (*S. coelicolor* avec le plasmide pSET153-*adnAB*) sont apparues mais avec une taille significativement inférieure

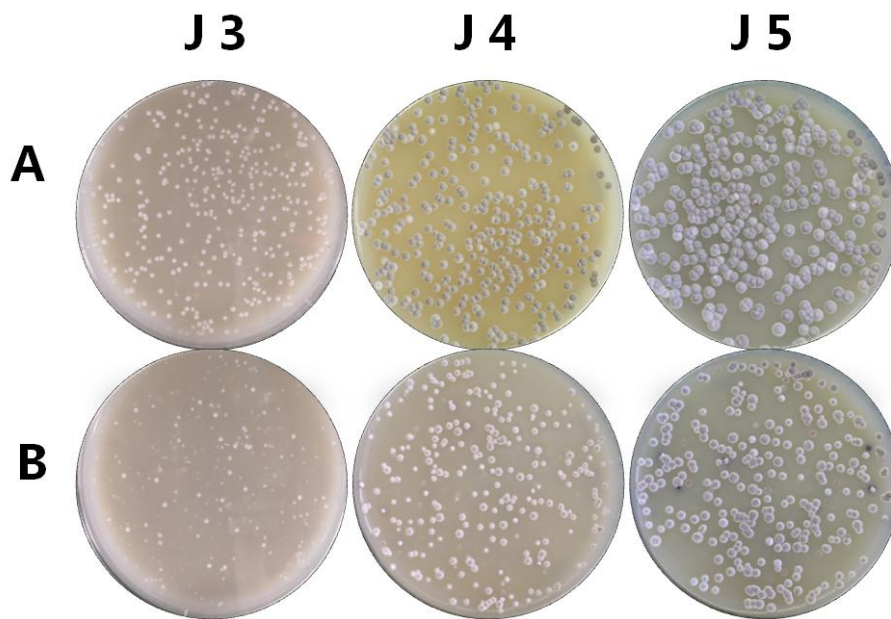


Figure 29. Phénotype colonial chez *S. coelicolor* en présence ou non d'une copie supplémentaire du locus *adnAB*

Les spores de la souche *S. coelicolor* portant le plasmide pSET153 (A) et la souche portant le plasmide pSET153-*adnAB* (B) ont été étalées sur milieu SFM. Les boîtes sont présentées après 3 jours (J 3), 4 jours (J 4) et 5 jours (J 5) d'incubation à 30°C.

aux colonies de la souche de référence. Par ailleurs, ces colonies *SCO/adnAB* présentent une hétérogénéité de taille, hétérogénéité toujours visible au 4^{ème} jour. Après 5 jours d'incubation, l'hétérogénéité n'est plus visible. Toutefois, le retard de croissance des colonies *SCO/adnAB* par rapport à la souche de référence est toujours décelable (davantage de « circonvolutions », caractéristiques de colonies d'âge avancé, ont été observées sur les colonies de la souche de référence que sur les colonies de la souche *SCO/adnAB*).

Cependant, cette hétérogénéité de la taille des colonies et le retard de croissance n'ont pas été observés chez *S. ambofaciens*.

Nous avons établi des courbes de croissance de ces souches en culture liquide. Pour cela, des spores prégermées servent d'inoculum à des cultures en milieu HT liquide, incubées à 30°C. Les prélèvements ont été réalisés toutes les heures et leur DO_{450nm} a été mesurée. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 30. Bien que préliminaires, ils semblent indiquer que la seconde copie d'*adnAB* aurait un impact négatif sur la croissance chez *S. ambofaciens* et *S. coelicolor*. Les souches avec deux copies sont entrées en phase exponentielle plus tardivement et ont montré une DO finale inférieure en phase stationnaire comparativement aux souches ne portant qu'une copie du locus.

3.1.5.1. La résistance à la MMC

L'effet de la surexpression d'*adnAB* en réponse à des agents génotoxiques a également été évalué par la mesure de la sensibilité à la MMC des souches de *S. ambofaciens* portant une ou deux copies d'*adnAB*. Dans cette expérience, des quantités identiques de spores de *S. ambofaciens* portant une ou deux copies d'*adnAB* ont été mises en suspension dans 1 ml d'eau stérile et ont été exposées à 1 µg/ml de MMC pendant 3 h à 30°C. Pour témoin, un aliquot de spores non

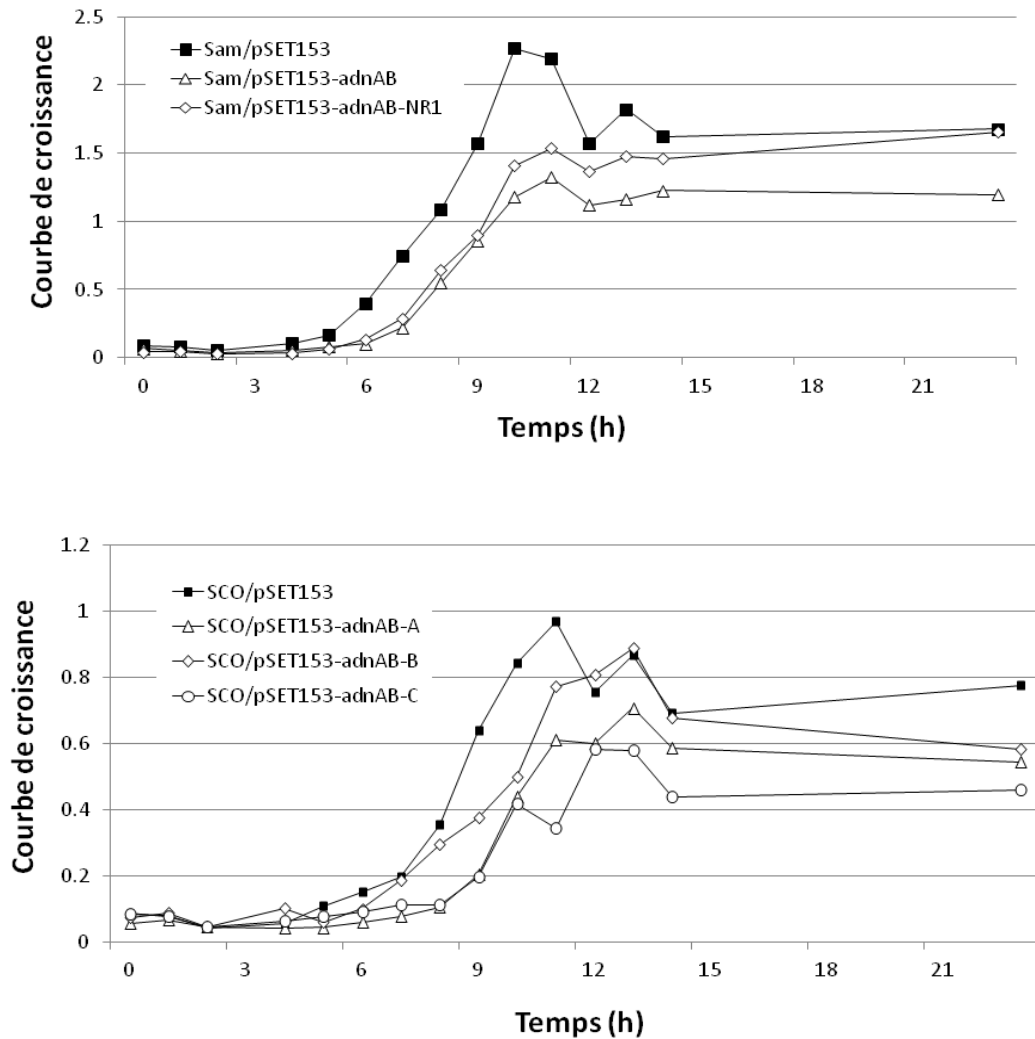


Figure 30. Croissance des souches de *Streptomyces* en présence ou non d'une copie supplémentaire du locus *adnAB*

Les courbes de croissance ont été établies en mesurant la DO_{450nm} des cultures de *S. ambofaciens* (A) et *S. coelicolor* (B) portant le plasmide pSET153 ou pSET153-*adnAB*. En abscisse, les temps sont indiqués en heures.

exposées a été traité en parallèle. Les spores ont ensuite été étalées sur boîte SFM par ensemencement spiral. Deux clones de la souche de contrôle et 9 clones de la souche portant deux copies ont été utilisés pour ce test. Les résultats, validés statistiquement (test Smirnov-Kolmogorov), ont montré une légère diminution du taux de survie à la MMC de la souche présentant deux copies d'*adnAB* (figure 31).

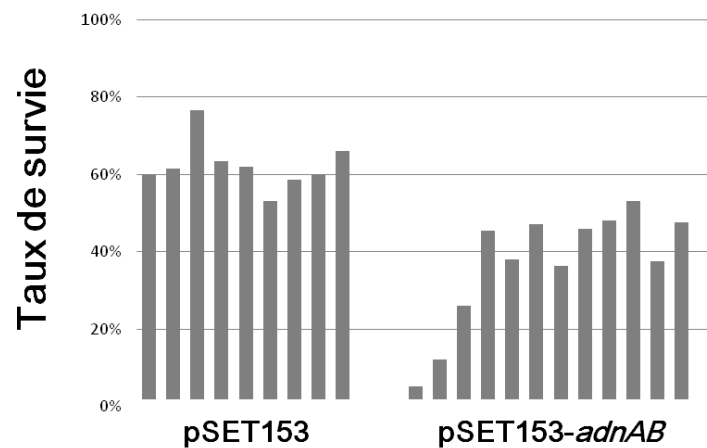


Figure 31. Sensibilité de *S. ambofaciens* à la MMC en présence d'une ou de deux copies du locus *adnAB*

La sensibilité des souches de *S. ambofaciens* portant le plasmide pSET153 (Sam/pSET153) et pSET153-*adnAB* (Sam/pSET153-*adnAB*) a été analysée par mesure de leur taux de survie à la MMC (1 µg/ml). Les spores de ces deux souches ont été traitées ou non à la MMC pendant 3 h puis étalées sur boîte SFM après une dilution appropriée afin de dénombrer les UFC. Le taux de survie représente le nombre d'UFC/ml de la souche traitée divisé par le nombre d'UFC/ml de cette souche non traitée. Ces expériences ont été réalisées sur trois clones indépendants de Sam/pSET153 et 9 clones indépendants de Sam/pSET153-*adnAB*. Chaque colonne représente le résultat d'une expérience sur l'un de ces clones.

Ainsi, la surexpression des gènes *adnAB* provoquerait une augmentation de la sensibilité de *Streptomyces* aux agents génotoxiques, à l'instar de la surexpression de *recBCD* qui impacte la survie cellulaire aux agents endommageant l'ADN chez *E. coli* (Đermić *et al.*, 2005).

3.1.5.2. L'instabilité génétique

Chez *S. ambofaciens*, l'instabilité génétique peut se traduire par la production de mutants coloniaux plus ou moins dépigmentés. Parmi les variants caractérisés, les colonies formant des papilles dépigmentées donnent à la génération suivante des colonies entièrement dépigmentées à hautes fréquences, lesquelles présentent de larges réarrangements chromosomiques. La comparaison des phénotypes coloniaux des souches de *S. ambofaciens* DSM40697 ayant une ou deux copies d'*adnAB*, après une incubation d'une dizaine de jours sur milieux SFM et HT, révèle une différence

du nombre de papilles par colonie. En effet, nous avons pu observer l'apparition de papilles sur certaines colonies après 12 jours d'incubation. Néanmoins, par rapport à la souche de référence, la souche présentant deux copies d'*adnAB* montre plus de colonies à papilles et davantage de papilles par colonie (figure 32). Ainsi, la seconde copie d'*adnAB* semble favoriser l'instabilité génétique de *S. ambofaciens*.

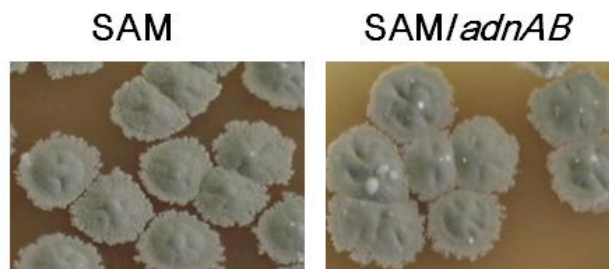


Figure 32. Phénotype colonial de *S. ambofaciens* en présence d'une ou deux copies du locus *adnAB*

Les spores de la souche *S. ambofaciens* DSM40697 avec le plasmide pSET153 (A) et avec plasmide pSET153-*adnAB* (B) ont été étalées sur milieux SFM et incubées à 30°C pendant 10 jours.

3.2. La recombinaison illégitime

Depuis la mise en évidence, par les analyses *in silico*, d'homologues de la protéine eukaryotique Ku chez certains organismes prokaryotiques, tels que *M. tuberculosis*, *B. subtilis* et *S. coelicolor* (Aravind and Koonin, 2001), plusieurs équipes se sont attachées à la caractérisation d'un mécanisme NHEJ chez les bactéries, notamment, *M. tuberculosis* et *B. subtilis* (Pitcher *et al.*, 2005b; Weller *et al.*, 2002). Concernant *Streptomyces*, très peu de données sont disponibles sur l'existence d'un NHEJ. Très récemment néanmoins, Zhang *et al.* (2012) ont réalisé la délétion de deux gènes de *S. avermitilis*, nommés *ku1* et *ku2*, mais ces mutants n'ont montré aucun phénotype particulier, à l'exception d'une légère sensibilité au méthanesulfonate d'éthyl, un agent mutagène alkylant, et une très légère augmentation de l'efficacité de RH. La deuxième partie de ma thèse a porté sur l'identification d'acteurs potentiellement impliqués dans le système NHEJ chez notre bactérie modèle : *Streptomyces*.

Cette partie de mes travaux a été initiée en collaboration avec Ludovic Chipot, doctorant dans l'équipe, et soutenue par l'ANR Streptoflux (2008-2011).

3.2.1. Identification *in silico* d'acteurs potentiel du NHEJ de *Streptomyces*

Initialement, des analyses *in silico* ont été réalisées sur les 20 génomes de *Streptomyces* dont le génome est entièrement séquencé et assemblé afin d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans le système NHEJ. La recherche de gènes homologues des gènes *rv0937c* et *rv0938* de *M. tuberculosis*, codant respectivement les protéines Ku et LigD, a été effectuée par BlastP. Par ailleurs, le génome de *M. tuberculosis* contient un autre locus (*rv3731-rv3730c*) codant respectivement une ligase LigC et une polymérase. LigC pallie partiellement la déficience de LigD selon Gong *et al.* (2005). Ainsi ces deux gènes ont eux-aussi été utilisés comme appâts dans la recherche *in silico*.

3.2.1.1. Identification des homologues de Ku

Selon les espèces, de 1 à 3 gènes codant potentiellement une protéine apparentée à la protéine Ku de *M. tuberculosis* (Rv0937c) peuvent être identifiés (tableau 4).

Parmi les 20 génomes analysés :

- 9 présentent un seul homologue de *ku*.
- 9 présentent deux homologues de *ku*.
- 2 présentent trois gènes homologues : il s'agit de *S. violaceusniger* et *S. coelicolor*. Chez *S. coelicolor*, ces trois gènes ont été nommés *kuA* (SCO5309), *kuB* (SCO0601) et *kuC* (SCP1.68).

Afin d'étudier l'orthologie de ces homologues de *ku*, nous avons effectué un blastP en utilisant les séquences protéiques déduites des trois gènes de *S. coelicolor* (*kuA*, *kuB* et *kuC*) sur les 20 génomes de *Streptomyces* étudiés (tableau 4). Nous avons remarqué qu'au moins un orthologue de *kuA* est présent dans les génomes de *Streptomyces* avec une identité protéique comprise entre 53 et 83%. Par contre, les orthologues de *kuC* ont été observés dans 10 génomes de *Streptomyces* avec 55 à 73% d'identité au niveau protéique. Parmi ces 10 gènes *kuC*, 4 sont plasmidiques et 4 sont co-localisés avec un gène codant probablement une ligase. Chez *Streptomyces collinus*, il est co-localisé avec *kuA* alors que chez *S. avermitilis*, *kuC* est isolé des autres acteurs potentiels du NHEJ.

3.2.1.2. Identification des homologues des ligases

Concernant la protéine LigD de *M. tuberculosis*, compte tenu de sa structure complexe (présence de plusieurs domaines fonctionnels) et de l'absence de gène codant une protéine homologue sur toute la longueur chez les *Streptomyces*, les recherches d'homologie ont été menées séparément pour le domaine ligase

(LigDom), le domaine nucléase (NucDom) et le domaine polymérase (PolDom) (tableau 4).

Pour le domaine ligase, 12 génomes sur 20 présentent un gène homologue avec une identité d'environ 40% ; ce gène est nommé *ligD*. Ce gène est souvent co-occurent (8/20) voire co-localisé (4/20) ou co-absent (6/20) avec le gène *kuC*. L'utilisation comme appât en BlastP de l'autre ligase ATP-dépendante, LigC (Rv3731) de *M. tuberculosis*, révèle l'existence systématique d'un gène homologue dans les 20 génomes de *Streptomyces* avec 55% à 62% d'identité au niveau protéique ; ce gène est nommé *ligC*.

Quant au domaine polymérase de *rv0938*, un gène présentant une identité au niveau protéique de 41% à 45% est identifié dans chacun des 20 génomes ; ce gène a été nommé *polK*. De plus, un gène homologue de *rv3730c* a également été détecté dans tous les génomes et nommé *polR*. Par ailleurs, il est à noter que *polK* et *polR* sont co-localisés avec *kuA* et *ligC* respectivement, constituant les deux loci conservés *kuA-polK* et *ligC-polR*. L'unique exception concerne *Streptomyces* sp. Tu6071 où *polR* n'est pas co-localisé avec *ligC*.

En ce qui concerne le domaine nucléase de *rv0938*, 12 génomes contiennent un gène en codant un homologue avec une identité protéique de 43% à 50%. Par ailleurs, ces gènes codant un homologue de NucDom semblent être souvent co-occurents ou co-absents avec *ligD* et *kuC*. Leur co-occurrence peut être observée dans 10 génomes et leur co-absence dans 7 génomes. Chez *Streptomyces* sp. FxanaD5, le gène codant vraisemblablement NucDom est à proximité immédiate de *ligD*, les gènes étant séparés par quelques CDS.

	<i>kuA</i>	<i>polK</i>	<i>ligC</i>	<i>polR</i>	<i>kuC</i>	<i>ligD</i>	<i>nucdom</i>	<i>kuB</i>
<i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC10712	SVEN_5002	SVEN_5001	SVEN_6394	SVEN_6395				
<i>Streptomyces rapamycinicus</i> NRRL 5491	M271_20650	M271_20645	M271_07560	M271_07565				
<i>Streptomyces</i> sp. PAMC26508	F750_4842	F750_4841	F750_6167	F750_6168	F750_2703	F750_2702	F750_0875	
<i>Streptomyces</i> sp. FxanaD5 [~]	WP_019522955	WP_019522954	WP_019525001	WP_019525000		WP_019525574	WP_019525579	
<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu 4113	Strvi_1038 Strvi_6521 Strvi_4745	Strvi_1039	Strvi_3581	Strvi_3580		Strvi_5345		
<i>Streptomyces</i> sp. Tu6071	STTU_1942	STTU_1943	STTU_0771	STTU_0755	STTU_p0165		STTU_4357	
<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	SAV_2945 (Ku1) ^b	SAV_2946	SAV_1697	SAV_1696	SAV_879 (Ku2) ^p			
<i>Streptomyces</i> sp. SirexAA-E	SACTE_4537	SACTE_4536	SACTE_5876	SACTE_5877	SACTE_2358	SACTE_2357	SACTE_0551	
<i>Streptomyces flavogriseus</i> ATCC 33331	Sfla_1981	Sfla_1982	Sfla_0697	Sfla_0699	Sfla_4020	Sfla_4021	Sfla_5714	
<i>Streptomyces hygrosopicus</i> 5008	SHJG_6418	SHJG_6417	SHJG_7610	SHJG_7611	SHJG_p1006	SHJG_2086	SHJG_2075	
<i>Streptomyces hygrosopicus</i> TL01	SHJGH_6179	SHJGH_6178	SHJGH_7371	SHJGH_7372	SHJGH_p1006	SHJGH_1851	SHJGH_1840	
<i>Streptomyces bingchenggensis</i> BCW-1	SBI_06359	SBI_06360	SBI_08910	SBI_08909				
<i>Streptomyces scabiei</i> 87.22	SCAB_29491	SCAB_29521	SCAB_13591	SCAB_13581				
<i>Streptomyces collinus</i> Tu 365	B446_24990	B446_24985	B446_30620	B446_30625	B446_25000	B446_04080	B446_04035	
<i>Streptomyces griseus</i> NBRC 13350	SGR_2195	SGR_2196	SGR_1024	SGR_10243	SGR_6689	SGR_6690	SGR_6488	
<i>Streptomyces cattleya</i> DSM 46488	SCAT_5458	SCAT_5459	SCAT_5513	SCAT_5514		SCAT_5457	SCAT_5571	
<i>Streptomyces albus</i> J1074	XNR_1492	XNR_1493	XNR_0334	XNR_0333				
<i>Streptomyces fulvissimus</i> DSM 40593	SFUL_5135	SFUL_5134	SFUL_6473	SFUL_6474			SFUL_645	
<i>Streptomyces davawensis</i> JCM 4913	BN159_3066	BN159_3067	BN159_1716	BN159_1715		BN159_8336		
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	SCO5309	SCO5308	SCO6707	SCO6709	SCP1.68	SCO7345	SCO7355	SCO0601

Tableau 4. Acteurs potentiels de NHEJ chez *Streptomyces*

^a: la référence de la séquence est indiquée en l'absence d'étiquette du locus.

^b: SAV_2945 et SAV_879 codent Ku1 et Ku2 respectivement (Zhang *et al.*, 2012).

^c: trois gènes homologues de SCO5309 (*kuA*) ont été observés chez *Streptomyces violaceusniger* Tu 4113., striv_1038 est potentiellement l'orthologue de *kuA* vue l'homologie la plus forte avec SCO5309 parmi les trois et la co-localisation avec *polK*.

3.2.2. Caractérisation d'acteurs potentiels du NHEJ de *S. ambofaciens*

3.2.2.1. Identification *in silico* des acteurs potentiels du NHEJ de *S. ambofaciens*

Le génome complet de l'espèce *S. ambofaciens*, étudiée au laboratoire, est en cours de finition au laboratoire (collaboration avec J-L Pernodet, IGM, Orsay). Nous avons donc recherché des acteurs potentiels du NHEJ dans ce génome, et comme chez *S. coelicolor*, phylogénétiquement proche, 3 homologues de *rv0937* (*ku*) peuvent être identifiés et correspondent à *kuA*, *kuB* et *kuC* (figure 33). La localisation de ces gènes sur le chromosome est intéressante : *kuA* est situé dans la région centrale et,

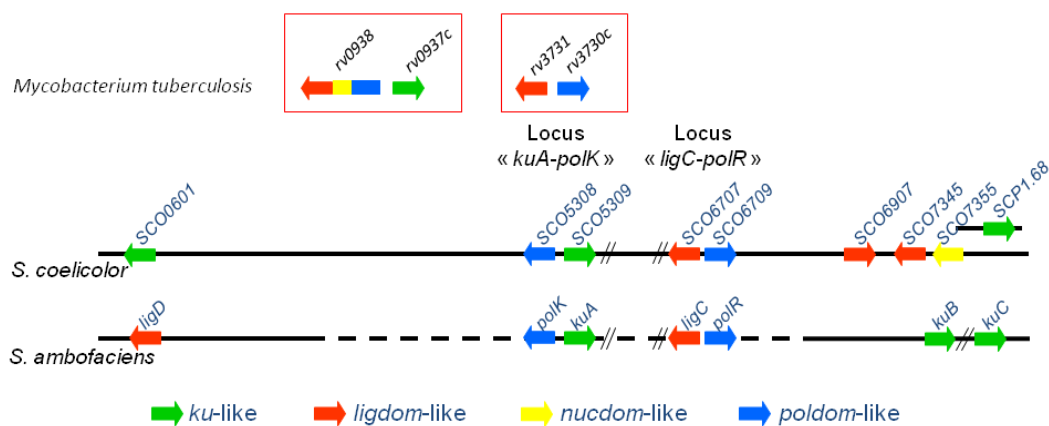


Figure 33. Représentation schématique de l'organisation génétique des acteurs potentiels du NHEJ des *S. coelicolor* et *S. ambofaciens*.

comme dans tous les génomes analysés précédemment, co-localisé avec un gène homologue à PolDom (*polK*) alors que *kuB* et *kuC* se trouvent dans la zone de synténie dégénérée du bras droit. Le gène homologue de LigDom (*ligD*) dans le

génomique de *S. ambofaciens* est situé dans le bras gauche, loin de *kuC*. En plus, *ligC* et *polR* sont aussi présents et sont aussi co-localisés.

3.2.2.2. Caractérisation *in vivo* des acteurs potentiels du NHEJ de *S. ambofaciens*

Afin de caractériser les acteurs identifiés par la recherche *in silico* chez *S. ambofaciens*, nous avons construit des mutants pour chaque acteur potentiel et mesuré la sensibilité de ces mutants aux agents endommageant l'ADN dans le but d'évaluer leur implication dans la réparation de l'ADN.

- Caractérisation des homologues de *ku* de *S. ambofaciens*

- a) Construction des simples mutants ΔkuA , ΔkuB et ΔkuC

Les simples mutants délétés indépendamment de *kuA*, *kuB* et *kuC* ont été créés par PCR-targeting en utilisant les BAC recombinants BAA16ZB5, BAB6ZC3 et BAB27ZF1 respectivement. Ces BAC ont été d'abord modifiés par remplacement du gène de résistance au chloramphénicol par un gène de résistance à la kanamycine car les *Streptomyces* sont naturellement résistants au chloramphénicol, empêchant l'utilisation de ce marqueur dans la procédure de sélection des événements d'intégration au génome. Les BAC modifiés BAA16ZB5, BAB6ZC3 et BAB27ZF1 ont été introduits dans la souche DY330 dans laquelle le système λ RED (*gam*, *bet*, *exo*) favorise la recombinaison homologue avec l'ADN linéaire. Puis, une amplification par PCR a été réalisée sur une matrice : le plasmide pSMP88T dérivant de la cassette de mutagenèse *att3 Ω aac+* (Raynal *et al.* 2006) au sein de laquelle une origine de transfert a été ajoutée (Chipot, 2007). Les amorces utilisées au cours de cette amplification ont été dessinées avec des extensions en 5' correspondant aux régions flanquant *kuA*, *kuB* et *kuC*. Les amplifiats ainsi obtenus ont été introduits indépendamment par transformation dans les souches DY330 portant ces BAC. Une sélection des transformants sur apramycine permet de sélectionner les BAC dérivés

de BAA16ZB5, BAB6ZC3 et BAB27ZF1 délétés de *kuA*, *kuB* et *kuC* respectivement. Par la suite, ces BAC recombinants ont été introduits dans la souche *S. ambofaciens* ATCC23877 par conjugaison intergénérique. Après deux cycles de croissance en milieu SFM solide avec une pression de sélection sur la résistance à l'apramycine, une sélection négative à la résistance à la kanamycine a permis de sélectionner les clones qui ont subi les deux crossing-overs. Après validation de ces constructions, le plasmide pOSK1112 portant le gène codant une excisionase a été introduit à son tour par conjugaison dans les souches mutantes afin d'exciser la cassette de mutagenèse : la présence de sites *attL* et *attR* de part et d'autre de la cassette, permet en effet une recombinaison site-spécifique entre eux par l'action de l'excisionase.

Les souches mutantes de *S. ambofaciens* ΔkuA , ΔkuB et ΔkuC ont été complémentées par un plasmide contenant un allèle sauvage des gènes respectifs sous le contrôle de sa propre séquence promotrice. Les plasmides recombinants ont été créés par clonage de produits de PCR dans le plasmide intégratif pSET152.

b) Sensibilité de ΔkuA aux agents endommageant l'ADN

Le gène *kuA* étant le seul, parmi les trois gènes homologues de *ku*, à être conservé dans tous les génomes de *Streptomyces* et étant systématiquement co-localisé avec *polK*, *kuA* constituait le meilleur candidat, parmi les gènes *ku*, pour être un acteur principal du NHEJ de *Streptomyces*. La souche ΔkuA a été exposée à plusieurs agents génotoxiques afin de mettre en évidence l'éventuel rôle de *kuA* dans la réparation de l'ADN.

Sensibilité de ΔkuA à la MMC

Les spores de deux mutants ΔkuA indépendants ont été exposées à la 1 $\mu\text{g/ml}$ de MMC pendant 3 h puis étalées sur milieu SFM après une série de dilutions. Le comptage des UFC a été fait après 5 jours d'incubation à 30°C. Le taux de survie a

été calculé par le rapport entre le nombre d'UFC/ml obtenues après traitement à la MMC et le nombre d'UFC/ml dans la suspension non traitée.

Le résultat a montré que le mutant ΔkuA présente une survie moindre (d'un facteur 100) à ce traitement par rapport à la souche sauvage. En revanche, la survie est partiellement restaurée lorsque le mutant est complétement par la copie ectopique de *kuA* (figure 34). Ce résultat a été observé de façon reproductible pour les deux mutants ΔkuA indépendants et leur complémentant respectif.

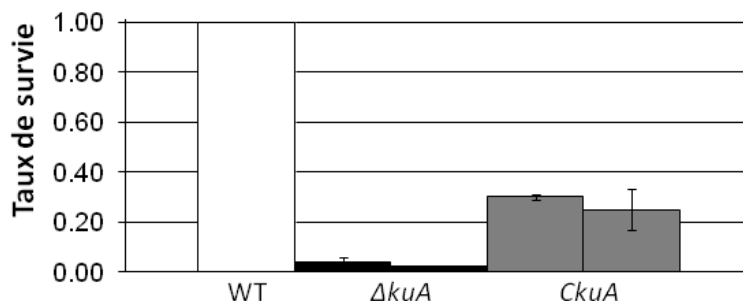


Figure 34. Sensibilité de *S. ambofaciens* ΔkuA à la MMC

La sensibilité de la souche *S. ambofaciens* sauvage (WT), des deux souches mutantes de ΔkuA indépendantes et de leur complémentant respectif (*CkuA*) a été analysée par mesure de leur taux de survie à la MMC. Les spores de ces souches ont été traitées ou non à la MMC (1 $\mu\text{g/ml}$) pendant 3 h et puis étalées sur boîte après avoir été diluées. Le taux de survie a été calculé par le nombre d'UFC/ml de la suspension traitée divisé par le nombre d'UFC/ml dans la suspension non traitée.

Sensibilité de ΔkuA aux rayonnements gamma

Les spores du mutant ΔkuA ont été exposées aux rayonnements gamma en différentes doses (0-5 KGy) puis étalées sur milieu SFM. Le comptage des UFC a été réalisé après 5 jours d'incubation à 30°C. Cette expérience a été réalisée par Ludovic Chipot, doctorant au sein de l'équipe, dans le laboratoire de Fabrice Confalonieri (IGM, Orsay).

Le résultat a montré une diminution d'un facteur 8 du taux de survie pour le mutant ΔkuA par rapport à la souche sauvage après exposition à un rayonnement gamma d'énergie variable (1 à 4 KGy). En revanche, la souche mutante ne présente pas cette diminution quand elle est complémentée par le gène kuA (figure 35). Les deux mutants indépendants et leur complémenté montrent des résultats comparables.

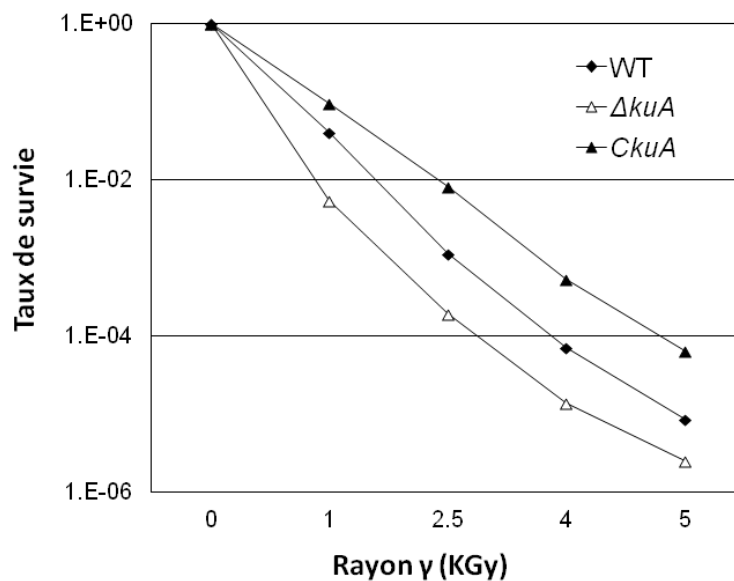


Figure 35. Sensibilité de *S. ambofaciens* ΔkuA au rayonnement gamma

La sensibilité de la souche *S. ambofaciens* sauvage (WT), de la souche mutante de ΔkuA et de son complémentant $CkuA$ a été analysée par mesure de leur taux de survie aux rayonnements gamma à différentes doses (0-5 kGy). Cette expérience a été réalisée en triplicat.

Sensibilité de ΔkuA au flux d'électrons

L'exposition à un faisceau d'électrons a également été testée comme agent physique entraînant des DSB. Différents doses ont été imposées à des spores du mutant ΔkuA en suspension. Deux clones indépendants ΔkuA et leur complémentant ont été testés. Ensuite, les spores exposées ont été étalées sur SFM par ensemencement spiral puis incubées pendant 5 jours à 30°C.

Le résultat a confirmé que le mutant ΔkuA est plus sensible aux agents endommageant l'ADN que la souche sauvage ; ainsi, la sensibilité augmente d'un facteur 4 à la dose 0,46 KGy notamment. La complémentation par une copie de kuA restaure partiellement la chute du taux de survie de ΔkuA à ce traitement (figure 36).

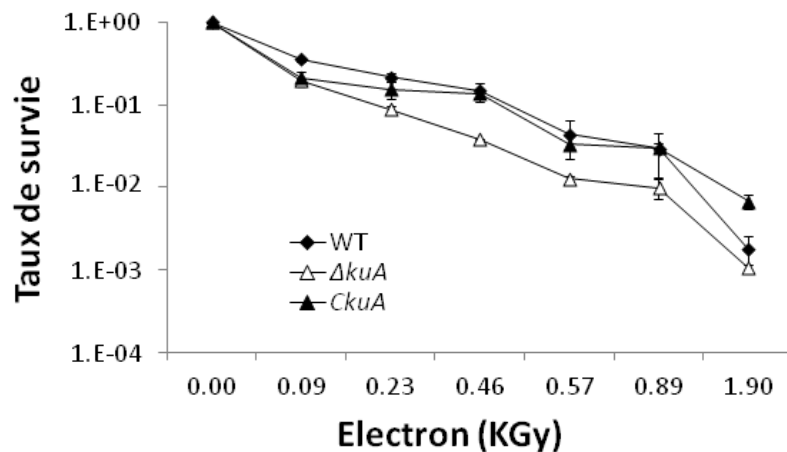


Figure 36. Sensibilité de *S. ambofaciens* ΔkuA au flux d'électrons

La sensibilité de la souche *S. ambofaciens* sauvage (WT), de la souche mutante ΔkuA et de son complémentant $CkuA$ a été analysée par mesure de leur taux de survie à un flux d'électrons (0-2 kGy).

L'ensemble de ces résultats a démontré l'implication de kuA dans la réparation de l'ADN, suggérant qu'il est potentiellement un acteur du NHEJ de *Streptomyces*.

c) Sensibilité de ΔkuB et ΔkuC aux agents endommageant l'ADN

Sensibilité au flux d'électrons

La même expérience d'exposition des spores à un flux d'électrons d'énergie variable a également été réalisée sur des spores des mutants ΔkuB et ΔkuC . Pour chaque souche un clone a été testé. Un premier résultat a montré que le mutant ΔkuB n'est pas plus sensible à ce traitement que la souche sauvage. En revanche, une

augmentation de la sensibilité du mutant ΔkuC a été observée et la complémentation par une copie de gène kuC restaure le taux de survie de ce mutant (figure 37). Ces résultats ont suggéré que kuC serait impliqué dans la réparation de l'ADN. En revanche, l'absence de sensibilité accrue chez le mutant ΔkuB ne signifie pas qu'il ne participe pas à la réparation de l'ADN. En effet, il est possible que KuA pallie le défaut de KuB.

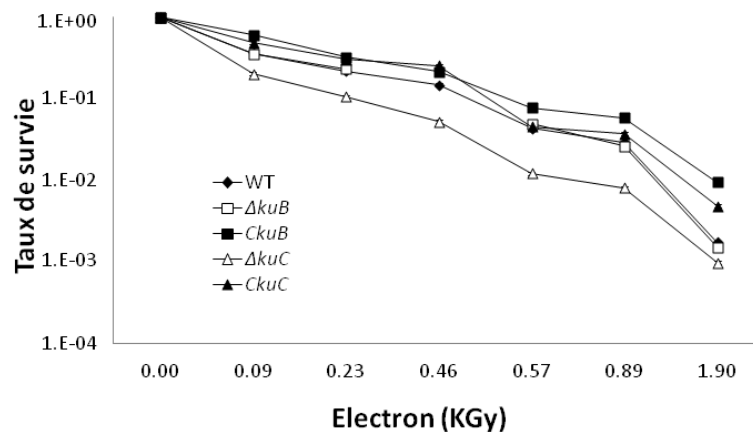


Figure 37. Sensibilité de *S. ambofaciens* ΔkuB et ΔkuC au flux d'électrons

La sensibilité de la souche sauvage (WT) et des simples mutants de *S. ambofaciens* ΔkuB et ΔkuC et leur complémentation respectif $CkuB$ et $CkuC$ a été analysée par mesure de leur taux de survie suite à une exposition à des rayonnements électroniques (0-2 KGy).

d) Construction des doubles et du triple mutants ku de *S. ambofaciens*

Les tests de sensibilité pour les trois simples mutants nous ont permis de suggérer l'implication de kuA et kuC dans la réparation de l'ADN. Par contre, le rôle de ces deux gènes voire de kuB pourrait être mieux caractérisé par la constitution de contexte génétique déficient pour plusieurs de ces gènes simultanément.

Ainsi, la construction de doubles mutants ($\Delta kuAB$, $\Delta kuAC$) et du triple mutant ($\Delta kuABC$) a été entreprise. Le simple mutant ΔkuA a servi de base à la construction de ces nouveaux contextes. Pour les doubles mutants, les BAC BAB6ZC3 ΔkuB et

BAB27ZF1 ΔkuC ont été introduits indépendamment dans la souche mutante ΔkuA par conjugaison intergénérique. Après deux cycles en présence de l'antibiotique apramycine, les clones $\Delta kuAB$ et $\Delta kuAC$ ont été sélectionnés par la perte de résistance à la kanamycine, puis leur structure a été vérifiée par PCR.

Pour la construction du triple mutant, nous avons tiré profit de la présence des deux gènes kuB et kuC dans l'insert du BAC BAB27ZF1. Le BAC déjà muté pour kuC (BAB27ZF1 ΔkuC) a servi de base. Premièrement la souche d'*E. coli* DH5 α portant ce BAC a été transformée par le plasmide pOSK1112 afin d'exciser la cassette de mutagenèse conférant la résistance à l'apramycine intégrée à la place de kuC . Les clones excisés ont été sélectionnés négativement par leur sensibilité à l'apramycine et vérifiés par PCR. Ensuite, une PCR-targeting a été réalisée sur le BAC BAB27ZF1 ΔkuC excisé afin d'y introduire la mutation ΔkuB et engendrer le BAC BAB27ZF1 $\Delta kuBC$. Puis, ce BAC a été introduit dans la souche mutante ΔkuA par conjugaison pour déléter simultanément les gènes kuB et kuC du chromosome. La résistance à l'antibiotique apramycine a permis la sélection des clones recombinés. Des PCR ont été réalisées pour vérifier la délétion effective de ces deux gènes.

e) Sensibilité des doubles et triple mutants ku aux agents endommageant l'ADN

Sensibilité à la MMC

Les spores des doubles mutants $\Delta kuAB$, $\Delta kuAC$ et du triple mutant $\Delta kuABC$ ont été traitées par la MMC (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Dans cette expérience, les doubles mutants ont un taux de survie équivalent à celui du simple mutant ΔkuA alors que le triple mutant $\Delta kuABC$ montrerait une diminution très légère de son taux de survie (figure 38). Ces expériences ont été menées avec 2 clones indépendants pour chacune des souches.

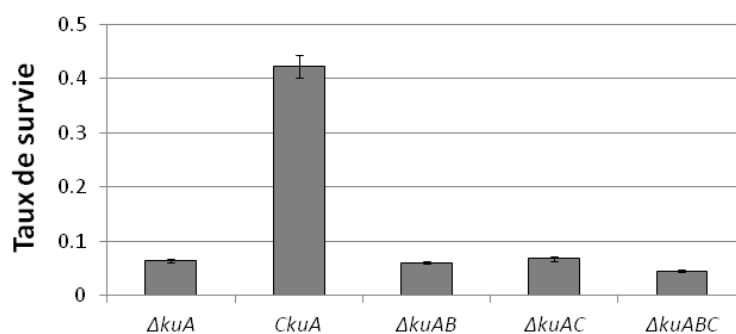


Figure 38 Sensibilité de *S. ambofaciens* doubles et triple mutants à la MMC

La sensibilité du simple mutant ΔkuA , de son complémentant- (*CkuA*), des doubles ($\Delta kuAB$, $\Delta kuAC$) et du triple ($\Delta kuABC$) mutants de *S. ambofaciens* a été analysée par mesure leur taux de survie à la mitomycine C (1 $\mu\text{g/ml}$). Cette expérience a été réalisée en triplicat.

Sensibilité au flux d'électrons

Un résultat préliminaire testant la sensibilité des doubles ($\Delta kuAB$, $\Delta kuAC$) et du triple ($\Delta kuABC$) mutants à un flux d'électrons a montré que ces mutants ne sont pas significativement plus sensibles que le simple mutant ΔkuA (figure 39).

Par conséquent, l'ensemble de ces résultats, d'une part, confirme que *kuB* n'est pas impliqué dans la survie à ces différents traitements endommageant l'ADN, et d'autre part, suggère que *kuC* ne semble pas jouer un rôle synergique avec *kuA*.

f) Phénotype colonial des mutants *ku*

Les différentes souches mutantes de *S. ambofaciens* (ΔkuA , ΔkuB et ΔkuC et les doubles mutants $\Delta kuAB$, $\Delta kuAC$ et le triple mutant $\Delta kuABC$) ont été étalées sur milieu SFM et incubées à 30°C. Leur croissance en solide ne semble pas être affectée et aucun effet sur le phénotype colonial n'a été observé comparativement à la souche sauvage.

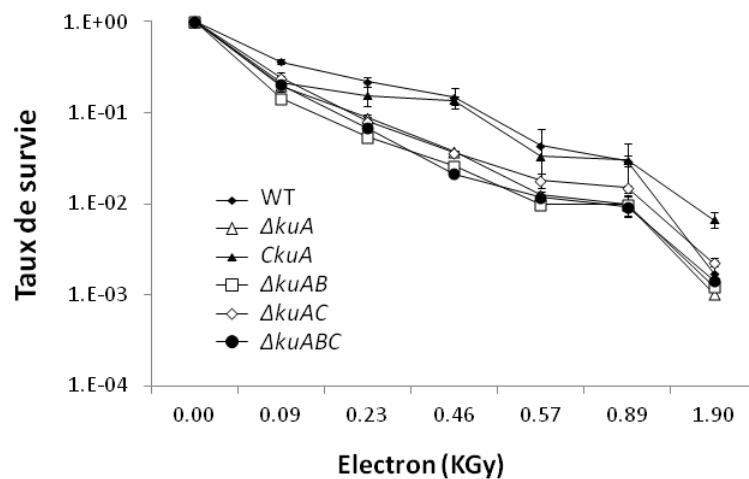


Figure 39 Sensibilité des doubles et du triple mutants *ku* au flux d'électrons

La sensibilité de la souche sauvage (WT), des doubles ($\Delta kuAB$ et $\Delta kuAC$) et du triple ($\Delta kuABC$) mutants a été analysée par mesure de leur taux de survie à des rayonnements électronique d'énergie différente (0-2 kGy). Le simple mutant ΔkuA et son complémentant ont servi de souches de référence. Un clone pour chaque souche a été utilisé.

- Caractérisation des mutants des gènes *ligC* et *ligD* de *S. ambifaciens*

Comme présenté dans les paragraphes précédents, plusieurs gènes codant des homologues des trois domaines de LigD de *M. tuberculosis* ont été détectés dans les génomes de *Streptomyces*. Parmi eux, *ligC* est conservé, alors que le gène *ligD* n'est pas systématiquement présent mais se trouve être plus proche de *ligD* de *M. tuberculosis*. Des simples mutants $\Delta ligC$ et $\Delta ligD$ ont été construits par PCR-targeting en utilisant les BAC BAB11ZA3 et BAA4ZD4 respectivement (même procédure que celle décrite précédemment).

a) Sensibilité aux agents endommageant l'ADN

Sensibilité au flux d'électrons

Les mutants $\Delta ligC$ et $\Delta ligD$ ont été exposés à un flux d'électrons (deux clones indépendants $\Delta ligC$, un $\Delta ligC$ complémenté, et trois clones indépendants $\Delta ligD$ ont été testés). Les taux de survie obtenus (figure 40) indiquent que les deux mutants

sont plus sensibles à ce traitement que la souche sauvage et que le mutant *ΔligD* est plus sensible que *ΔligC*. Cela suggère l'implication de ces deux gènes dans la réparation de l'ADN.

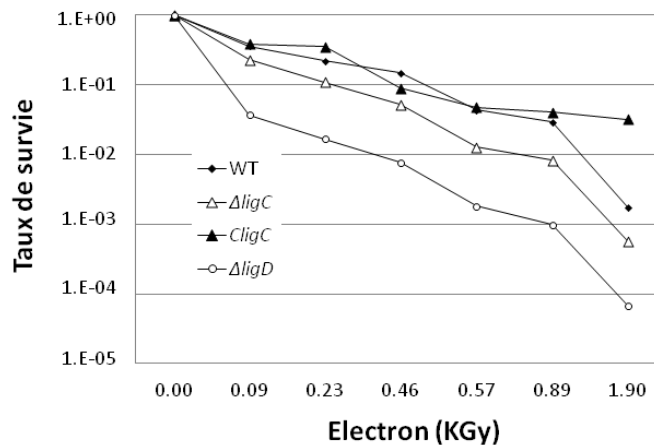


Figure 40 Sensibilité des souches de *S. ambofaciens* mutées pour ligase au flux d'électrons

La sensibilité de la souche sauvage (WT), des simples mutants *ΔligC* et *ΔligD* et du complémentant de *ΔligC* (*CligC*) a été analysée par mesure de leur taux de survie aux rayonnements électroniques de différentes énergies (0-2 kGy).

● Analyse d'expression des acteurs potentiels du NHEJ

Afin d'étudier l'expression des gènes *ku* en fonction du stade de croissance, les ARN totaux de la souche sauvage *S. ambofaciens* ont été extraits d'une culture en milieu HT liquide à différents temps correspondants à la phase exponentielle (4, 6 et 8 h de croissance), la phase de transition (9 h) et la phase stationnaire (11 h). Une étape de transcription inverse suivie d'une PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques des séquences des gènes *kuA*, *kuB* et *kuC* a ensuite été réalisée. Un témoin positif d'amplification a été réalisé sur l'ADN génomique.

Les gènes *kuA* et *kuC* montrent une expression phase-dépendante, et en l'occurrence, fortement accrue en phase tardive de croissance. Cette tendance est

plus forte pour *kuA* que pour *kuC*. En revanche, *kuB* montre une expression quasi-exclusivement décelable en phase stationnaire (figure 41).

Les gènes *lig*, montrent des profils d'expression distincts, avec *ligC* qui présente une expression phase-dépendante à l'image de *kuA*, et *ligD* dont l'expression n'est pas décelable dans les conditions testées (figure 41).

A noter que les gènes *kuA* et *ligC* qui appartiennent aux deux loci conservés parmi les acteurs du NHEJ potentiel de *S. ambofaciens* présentent un profil d'expression similaire, ce qui accrédite l'hypothèse d'un fonctionnement concertée dans le NHEJ.

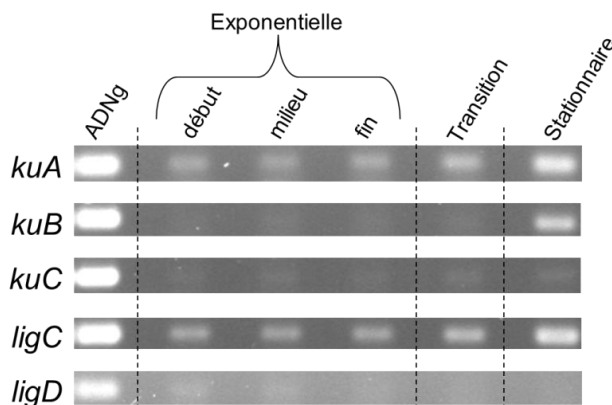


Figure 41. Expression des gènes *ku* et *lig* en fonction de la phase de croissance de *S. ambofaciens*.

- Localisation spatio-temporelle de KuA

Une fusion traductionnelle KuA-eGFP a été construite au locus chromosomique *kuA* afin d'observer la localisation sub-cellulaire de KuA dans des conditions physiologiques. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Claire Bertrand. Pour cela, la cassette amplifiable pSMP88T-*egfp* incluant la phase codante du gène eGFP (codant une version optimisée de la protéine fluorescente verte) a été insérée à l'extrémité 3' du gène, selon la démarche suivante.

Le gène codant l'eGFP provenant du plasmide pIJ8660 (Sun *et al.*, 1999) et porté par un fragment *XhoI* a été intégré dans le plasmide pSMP88T (au site *EcoRI*) pour donner le plasmide pSMP88T-*egfp*.

Ce plasmide a servi de matrice de PCR (long-range PCR, Taq, Takara) avec les oligonucléotides F et R (figure 42). L'amorce F s'hybride dans sa partie 3' avec la séquence 5' de l'eGFP et son extension 5' est homologue de la fin de la séquence codante de *kuA* à l'exclusion de son codon stop afin d'aboutir à une fusion traductionnelle. L'amorce R s'hybride en 3' avec le site *attR* et son extension 5' est homologue de la séquence en aval du codon stop du gène *kuA*.

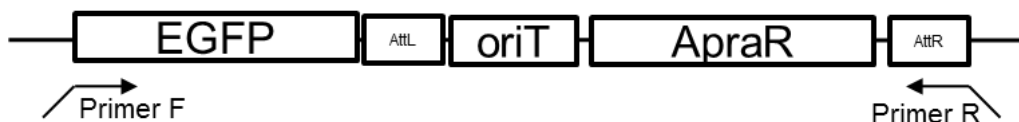


Figure 42. Schéma de la cassette portée par le plasmide pSMP88T-*egfp*.

Le produit d'amplification de la cassette a été introduit par électroporation dans la souche d'*E. coli* BW25113-pKD20 contenant le BAC BAA16ZB5 contenant le locus *kuA* (la résistance au chloramphénicol a été remplacée par celle conférant la résistance à la kanamycine). Des clones résistants à l'apramycine, donc contenant probablement les BAC recombinés avec le produit PCR ont ainsi pu être sélectionnés (*16B5KmΔCm-KuA:eGFP*). La construction a alors été vérifiée par séquençage.

L'étape suivante a consisté à introduire ce BAC recombiné chez *S. ambofaciens* par conjugaison intergénérique. La sélection d'exconjugants résistants à l'apramycine et sensibles à la kanamycine a permis d'isoler des souches de *S. ambofaciens* où le locus chromosomique *kuA* est remplacé par la fusion traductionnelle.

Afin de tester le caractère fonctionnel de cette fusion, deux clones indépendants ont été exposés à la MMC. Les taux de survie se sont avérés intermédiaires entre la souche mutante *kuA* et la souche sauvage. Ainsi, la conservation partielle du caractère fonctionnel de la fusion permet de supposer que la localisation subcellulaire de la fusion KuA-eGFP correspondra à une situation physiologique, et non à un artéfact.

Les contrôles ont consisté :

- d'une part à introduire le plasmide pIJ6902-EGFP chez *S. ambifaciens* (contrôle positif). Dans ce plasmide, l'expression de l'eGFP est inductible car le gène *egfp* est sous le contrôle du promoteur pTipA, inductible par le thiostrepton (concentration utilisée 20 µg/mL),
- d'autre part par l'introduction du plasmide pIJ6902 vide (contrôle négatif).

Des spores des différentes souches sontensemencées en milieu SFM solide additionné d'apramycine 50 µg/mL (selon la souche étudiée, le milieu est supplémenté ou non avec du thiostrepton à 20 µg/mL) au contact d'une lamelle enfoncée dans le milieu avec un angle d'environ 45°. Après une incubation de 48 h à 30°C, la lamelle est délicatement retirée de la boîte de Petri et montée avec une goutte d'eau sur une lame. Ce montage est immédiatement observé au microscope optique à transmission en épifluorescence et en contraste de phase. La croissance sur SFM pendant 48 h permet d'observer simultanément tous les stades de développement : mycélium végétatif, mycélium aérien, chaînettes de spores et spores matures isolées.

La fusion KuA-eGFP présente une fluorescence très nette dans les spores et très faible dans le mycélium avant septation (figure 43). Dans les hyphes végétatives, la fluorescence est proche de l'autofluorescence et se présente sous forme de foci plus ou moins intenses. La signification biologique de ces foci reste inconnue.

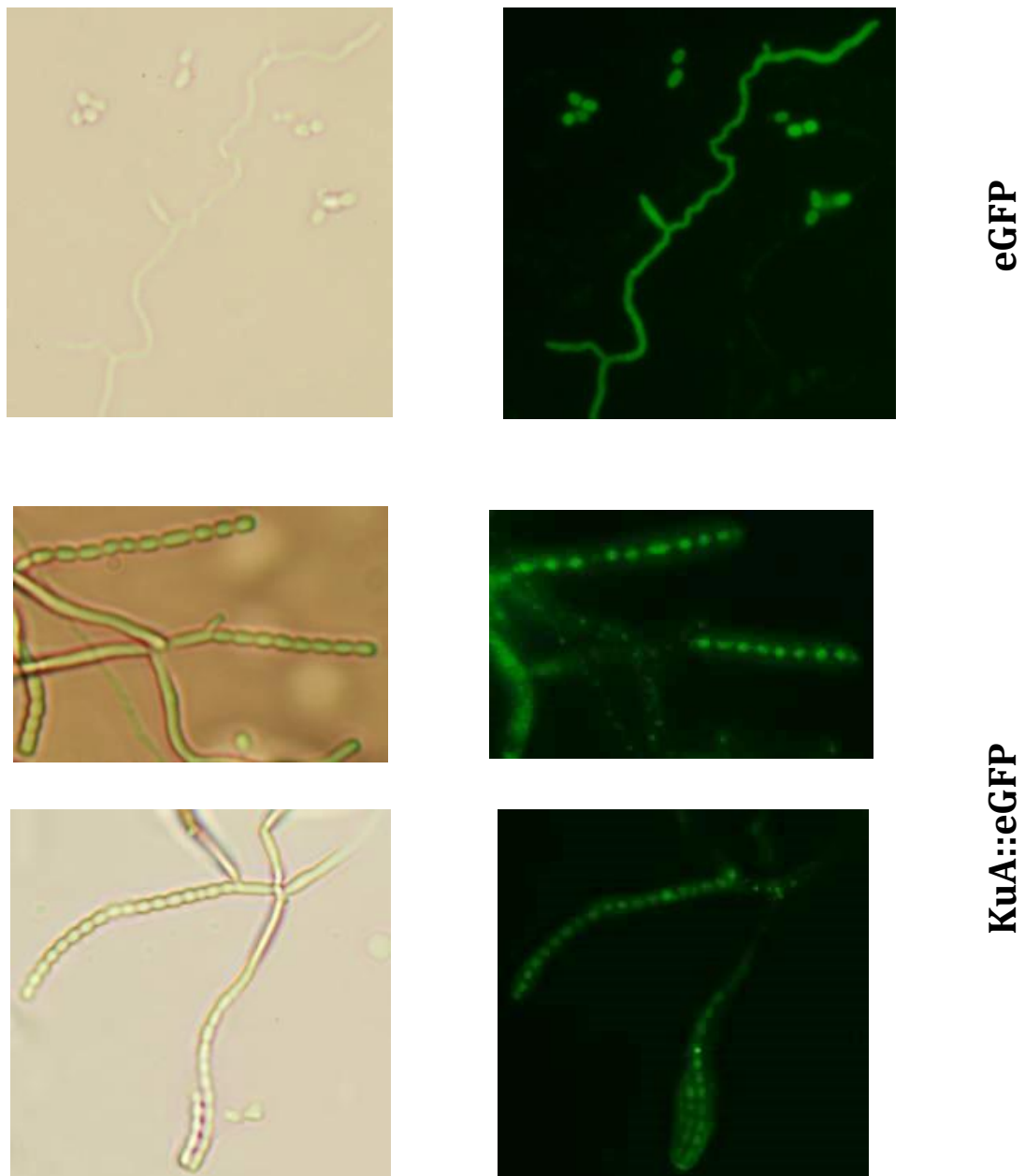


Figure 43. Localisation subcellulaire de KuA dans les spores.

Le contrôle eGFP correspond à la souche *S. ambifaciens* portant le plasmide pIJ6902-*egfp*. La fusion KuA-eGFP présente une localisation essentiellement dans les spores. Un microscope à fluorescence Zeiss Axiovert 200M MOT (Carl Zeiss Microimaging) et un objectif x100 ont été utilisés.

Des fusions ont également été réalisées avec les gènes *kuB* et *kuC* selon la même approche. La fusion KuB-eGFP n'est pas ou peu exprimée dans les conditions testées et est principalement visible sous forme de foci, essentiellement dans les spores. KuC-eGFP est exprimée de manière intermédiaire aux deux fusions

précédentes, à savoir dans les spores, mais de façon moins intense que KuA-eGFP, et très légèrement dans le mycélium sous forme de foci.

DISCUSSION

4. Discussion

Les objectifs de ce travail de recherche étaient d'explorer les mécanismes et les acteurs de la réparation des cassures doubles brin chez les *Streptomyces* - la recombinaison homologue et la recombinaison illégitime – afin de mieux comprendre leur impact respectif sur la variabilité et l'organisation génétique chez ces bactéries. Les résultats obtenus concernent d'une part l'identification et la caractérisation d'un acteur potentiel de l'étape pré-synaptique de la RH, l'hélicase nucléase AdnAB, et d'autre part l'identification d'acteurs putatifs du mécanisme NHEJ, en l'occurrence les protéines Ku et LigD.

4.1. L'hélicase-nucléase AdnAB, la recombinaison homologue et la survie chez les *Streptomyces*

4.1.1. L'hélicase-nucléase AdnAB est essentielle chez les *Streptomyces*

La recherche *in silico* d'homologues de RecBCD et AddAB, les hélicases-nucléases caractérisées chez les modèles bactériens *E. coli* et *B. subtilis*, dans les génomes de *Streptomyces* s'est avérée vaine, confirmant des données plus anciennes obtenues par Rocha *et al.* (2005). En revanche, la recherche d'homologues des protéines AdnAB de *M. tuberculosis* (MtuAdnAB) a permis de caractériser un unique locus conservé dans tous les génomes complets de *Streptomyces*. L'analyse de la séquence protéique d'AdnA et AdnB montre une très forte conservation des domaines protéiques hélicase et nucléase, et les analyses fonctionnelles réalisées par complémentation chez un mutant $\Delta recB$ d'*E. coli* suggèrent que le locus *adnAB* de *Streptomyces* code un homologue fonctionnel de RecBCD (activité nucléase, survie en présence et absence d'agent génotoxique).

La recherche d'homologue des hélicases-nucléases avait pour but de générer des mutants déficients pour la recombinaison homologue ; une approche de mutagenèse au locus chromosomique a alors été tentée. Cependant, aucun mutant nul n'a pu être obtenu sans la présence d'une copie ectopique du locus aussi bien chez *S. ambofaciens* que chez *S. coelicolor* A3(2). Ainsi, ce locus apparaît comme essentiel, et la létalité révèle l'absence de fonction redondante, même de façon résiduelle. Cependant, si l'activité enzymatique de ce complexe semble sans équivoque, c'est-à-dire hélicase-nucléase, les mécanismes dans lesquels elle est impliquée reste à définir. En effet, l'activité hélicase-nucléase est connue comme activité majeure de maturation des extrémités d'ADN lors de la recombinaison homologue. Hors, la recombinaison homologue n'est pas essentielle chez les bactéries, puisque la déficience en RecA, son acteur principal, est tolérée chez de nombreuses bactéries. Les *Streptomyces* ne dérogent pas à cette règle (Huang and Chen, 2006). Alors, dans quels autres processus cellulaires pourrait-elle être impliquée ?

La réplication ? Quelle pourrait être le rôle d'AdnAB dans la réplication ? Que sait-on de l'implication des hélicases-nucléases dans la réplication ?

Ces deux rôles ne sont pas exclusifs. Ainsi, AdnAB pourrait être impliqué à la fois dans la RH et dans la réplication, son caractère essentiel étant dû à ce second rôle.

4.1.1.1. Implication d'AdnAB dans la recombinaison homologue chez les *Streptomyces*

Bien qu'un faisceau d'éléments tendent à suggérer l'implication d'AdnAB dans la recombinaison homologue (analyses biochimiques, motifs protéiques hélicases-nucléases conservés, induction par les agents génotoxiques), aucun élément direct ne le démontre formellement. Plusieurs approches expérimentales ont été initiées dans ce sens. La délétion du locus *adnAB* n'ayant pas pu être sélectionnée, nous pouvons néanmoins tirer profit des souches portant deux copies d'*adnAB*

construites au cours de ces travaux. Ainsi, il est possible de mesurer et comparer les fréquences de remplacement d'un locus chromosomique, nécessitant la formation de deux crossing-overs, dans un contexte génétique portant une (sauvage) et deux copies d'*adnAB*. Il est vraisemblable que la recombinaison soit modulée à la baisse en présence de 2 copies d'*adnAB*. En effet, la probable augmentation de l'activité nucléasique (la transcription du locus montre une légère augmentation) pourrait perturber la formation des crossing-overs.

L'implication d'AdnAB dans la réparation des DSB sera également recherchée. Pour cela, un outil permettant d'induire des DSB a été mis en place chez *S. ambofaciens*. Dans ce système, l'enzyme I-SceI est exprimée de façon hétérologue chez des souches où un site unique I-SceI a été inséré dans la région centrale du chromosome. La survie chez des souches portant une et deux copies d'*adnAB* sera mesurée. Des expériences similaires pourront être réalisées chez *E. coli* grâce à un système expérimental développé par Susan M Rosenberg (Baylor College of Medicine, Houston, USA), et également basé sur l'utilisation d'I-SceI. Le caractère fonctionnel d'AdnAB de *S. ambofaciens* chez *E. coli* sera alors observé par complémentarité d'une mutation *recB* (déficiency pour RecBCD).

4.1.1.2. Les hélicases-nucléases assurent-elles des fonctions essentielles ?

Dans quels mécanismes sont impliquées les activités hélicases-nucléases ?

L'activité hélicase-nucléase est impliquée dans l'étape pré-synaptique de la recombinaison homologue. Cette étape est essentielle pour la formation des crossing-overs en permettant de maturer les extrémités d'ADN et de charger la protéine synaptique RecA. Chez la plupart des organismes bactériens, les mutations dans cet acteur majeur ne sont pas létales mais diminuent drastiquement la fréquence des événements de recombinaison. Des voies alternatives d'entrée en recombinaison

homologue ont été identifiées qui pallient la déficience de la voie majeure. Ainsi, chez *E. coli* et *B. subtilis*, la voie RecFOR compense partiellement la déficience en RecBCD ou AddAB (Clark *et al.*, 1984; Sanchez *et al.*, 2006). En revanche chez les mycobactéries où AdnAB est l'hélicase-nucléase majeure de la RH, la voie RecFOR ne semble pas être présente (Rocha *et al.*, 2005). RecBCD qui est également présente chez les mycobactéries, semble quant à elle impliquée dans le système SSA (dans lequel la recombinaison se fait entre deux séquences répétées d'un chromosome) RecA-indépendante (Gupta *et al.*, 2011). Cependant, la RH n'est pas totalement abolie chez un mutant *adnAB*, suggérant la présence d'autres acteurs pré-synaptiques (Gupta *et al.*, 2011).

La létalité n'est observable chez certains organismes comme *A. baylyi* que lorsque toutes les voies pré-synaptiques identifiées sont inactivées (Kickstein *et al.*, 2007). Cependant, même lorsque les différentes voies d'initiation de la recombinaison sont déficientes comme chez les mutants *E. coli* $\Delta recBC\Delta recJ$, *B. subtilis* $addAB\Delta recJ$ ou *Salmonella typhimurium* $\Delta recB\Delta recJ$, la létalité n'est pas systématique bien que la viabilité soit drastiquement réduite (Garzón *et al.*, 1996; Lloyd *et al.*, 1987; Lovett and Clark, 1984; Sanchez *et al.*, 2006).

Il est donc raisonnable de faire l'hypothèse que ce n'est pas la capacité à initier les événements de recombinaison qui constitue la fonction essentielle mais l'activité hélicase-nucléase. C'est ce que suggère les études sur la réplication et ses accidents, c'est-à-dire les effondrements de la fourche, menées par le Dr. Bénédicte Michel (Michel *et al.*, 2004). Chez *E. coli*, la délétion *recBC* est létale dans un contexte mutant pour les gènes *rep*, *dnaB* ou *hold*; *dnaB* code une hélicase réplivative, *rep* code une hélicase facilitant la progression de la fourche de réplication et *hold* code un composant de l'holoenzyme polymérase III (Flores *et al.*, 2002; Grompone *et al.*, 2002; Seigneur *et al.*, 1998). Ces mutations induisent un phénomène d'inversion de la

fourche de réplication (RFR pour replication fork reversal, figure 44). La forme RFR constitue un substrat de la RH. Dans ce contexte, les protéines RecB et RecC deviennent essentielles (Michel *et al.*, 2001). Cette même conclusion intervient chez la levure *S. cerevisiae* où Rad52, acteur clé de la RH, est nécessaire pour la viabilité des mutants de réplication où la maturation des fragments Okazaki est affectée (pour revue Aguilera *et al.*, 2000). Il est donc possible de supposer qu'AdnA et AdnB sont impliquées dans la réplication.

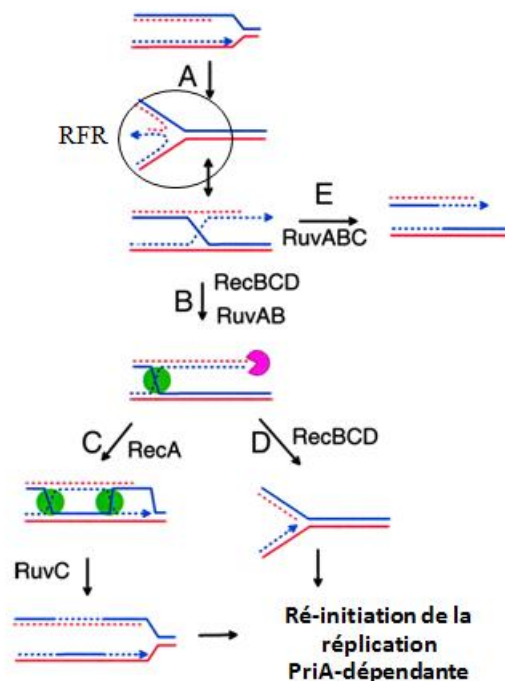


Figure 44. Modèle d'inversion de la fourche de réplication. D'après Michel *et al.* (2004)

Selon Michel *et al.* (2004), RecBCD et RecA peuvent initier un événement de recombinaison à un site *chi* présent sur l'ADN double brin. Les deux jonctions de Holliday (la première formée par l'inversion de la fourche, et l'autre par recombinaison homologue) seront résolues par RuvABC (figure 44 A, B, C). Si RecBCD rencontre la jonction de Holliday avant un site *chi* ou en absence de RecA, l'ADN

double brin est dégradé jusqu'à la jonction de Holliday, restaurant la fourche de réplication (figure 44 A, B, D). Dans les deux cas, la réplication redémarre par le processus dépendant de PriA.

En l'absence de RecBCD, la résolution de la jonction de Holliday peut entraîner la linéarisation de la chromatide par RuvABC (figure 44 A, E). Cette linéarisation aurait un impact dramatique sur la viabilité d'une bactérie dont le chromosome est linéaire puisqu'elle reviendrait à tronquer une des deux chromatides issues du cycle réplcatif (figure 45). Il est donc possible d'imaginer qu'AdnAB participe à la re-initiation de la réplication, et que dans le contexte du chromosome linéaire des *Streptomyces*, cette activité soit indispensable.

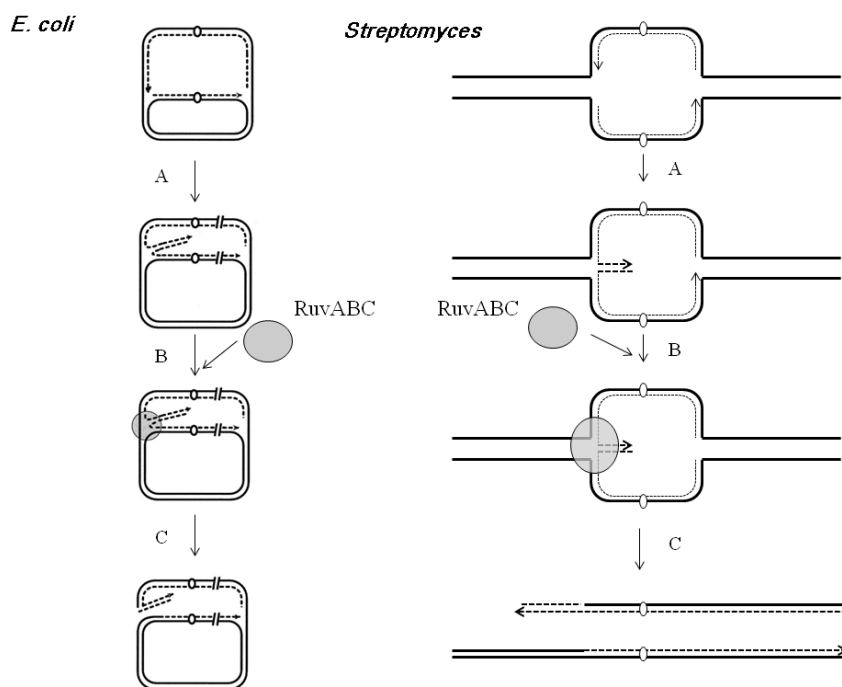


Figure 45. Conséquence de l'intervention de RuvABC sur une RFR chez *E. coli* (d'après Michel et al., 2001) et *Streptomyces*.

(A) la fourche de réplication est bloquée, les brins néoformés s'hybrident, formant une jonction de Holliday ; (B) la jonction est stabilisée par la fixation de RuvABC ; (C) Dans la souche déficiente pour RecBCD (chez *E. coli*) ou AdnAB (chez *Streptomyces*), RuvC résout la jonction de Holliday et provoque la linéarisation du chromosome chez *E. coli* ou la perte d'un segment chromosomique chez *Streptomyces*.

Chez *Streptomyces*, il est possible que l'implication d'AdnAB dans le redémarrage de la réplication constitue son caractère essentiel. Cependant, peu de choses sont connues sur les mécanismes de réplication chez les *Streptomyces*, hormis le mécanisme d'initiation (Zawilak-Pawlik *et al.*, 2005), et le rôle d'AdnAB dans ce mécanisme reste à définir.

Les souches de *Streptomyces* portant deux loci *adnAB* sont caractérisées par un retard de croissance et une rentrée précoce en phase stationnaire, une sensibilité accrue à un agent génotoxique (MMC) et une augmentation de l'instabilité génétique (augmentation du nombre de papilles dépigmentées à la surface des colonies). Ces phénotypes coloniaux sont-ils en cohérence avec l'implication d'AdnAB dans la recombinaison et/ou la réplication chromosomique ?

Corréler la modulation de la quantité d'AdnAB et la RH n'est pas évident sur la base des phénotypes observés chez les souches possédant deux copies d'*adnAB*. L'instabilité génétique accrue pourrait, par sa part, être liée à une augmentation de la recombinaison illégitime associée aux réarrangements génomiques caractérisés de longues dates chez *S. ambofaciens* (Thibessard and Leblond, 2014). Ainsi, si la recombinaison homologue est amoindrie, il est possible que la recombinaison illégitime soit plus sollicitée pour réparer des dommages subis par le génome, et notamment dans les régions terminales qui sont plus permissives aux réarrangements d'ADN. Chez *E. coli*, la surexpression de RecBCD réduit la résistance aux radiations UV et gamma (Đermić *et al.*, 2005). Chez *S. ambofaciens*, la présence de deux copies d'*adnAB*, entraîne une légère mais significative diminution de la résistance des spores à la MMC. Ainsi, il est possible que la réparation des dommages dépendant de la RH soit amoindrie dans ce contexte. En effet, il n'est pas démontré que la transcription accrue entraîne une augmentation de la quantité d'hélicase-nucléase, ni que l'augmentation de cette activité augmente les fréquences de recombinaison

homologue. Au contraire, il est possible que l'augmentation de l'activité nucléase perturbe le mécanisme de recombinaison homologue, notamment en dégradant les extrémités d'ADN de façon trop processive.

Les phénotypes observés pourraient également découler de la perturbation de la réplication. Ainsi, le retard de la croissance des colonies pourrait directement refléter une vitesse de réplication chromosomique diminuée ou perturbée. En effet, en l'absence des agents exogènes endommageant l'ADN, l'effondrement de la fourche de réplication peut être la conséquence de la formation spontanée de DSB ou de cassures simple brin qui se transforment en DSB au passage du réplisome. Chez *E. coli*, cet 'accident' pourrait intervenir une fois par cycle répliatif (Kuzminov, 2001). L'hypothèse est proposée qu'AdnAB joue également un rôle important dans la réplication ou/et la re-initiation de la réplication avec une concentration cellulaire strictement contrôlée. Chez *Streptomyces*, la surexpression d'*adnAB*, comme sa délétion, pourrait empêcher la réplication et/ou sa ré-initiation et donc impacterait la croissance mycélienne.

4.1.1.3. Dans quels autres mécanismes AdnAB de *Streptomyces* pourrait-il être impliqué ?

La structure linéaire des chromosomes eucaryotes et procaryotes ont en commun la nécessité de pallier la réplication incomplète des extrémités 3' des brins parentaux. Pour cela différents mécanismes ont été retenus au cours de l'évolution : des répétitions 'tampon' synthétisées par la télomérase eucaryote, la structure fermée 'tige-boucle' des extrémités chromosomiques chez les *Borrelia*, ou encore la présence de protéines terminales initiatrices de la réplication terminale ('patching') chez les *Streptomyces*.

Chez les *Streptomyces*, l'activité nucléase d'AdnAB pourrait être impliquée dans le mécanisme de réplication terminale. Ainsi, les protéines terminales Tpg et Tap recrutées sur les motifs tige-boucle terminaux initient une réplication permettant de compléter l'extrémité 5' (Bao and Cohen, 2001, 2003). L'hypothèse peut être faite qu'AdnAB soit requise pour cette étape cruciale. Il serait alors possible de tester l'essentialité du locus *adnAB* dans un contexte où la réplication terminale n'est plus requise. Ce contexte existe puisque des mutants au chromosome circulaire sont produits à hautes fréquences chez *S. ambofaciens* (Fischer *et al.*, 1997).

Le télomère eucaryote est une structure nucléoprotéique dont la fonction première est de protéger les extrémités du chromosome de la dégradation nucléasique. Ce complexe implique les protéines Ku et DNA-PKcs. De plus, certains acteurs de la RH seraient impliqués comme RAD54 (hélicase DEAD-like). Chez la souris, le double mutant homozygote RAD54/DNA-PKcs présente une fréquence accrue de fusions télomériques comparé aux simples mutants, suggérant l'effet complémentaire de RAD54 et DNA-PKcs dans la protection des télomères (Jaco *et al.*, 2003). L'activité hélicase d'AdnAB pourrait-elle jouer un rôle dans le maintien du télomère ? Des expériences d'interaction moléculaire *in vivo* (double hybride) ou encore d'immunoprécipitation pourraient permettre de révéler un rôle ou une localisation télomérique d'AdnAB. De même, la fréquence de fusion télomérique, phénomène observé chez les *Streptomyces* (Wenner *et al.*, 2003), pourrait être étudiée en présence de deux copies d'*adnAB*.

Il sera également possible de rechercher quelle activité spécifique d'AdnAB est essentielle. Pour cela, des mutations spécifiquement introduites dans les domaines protéiques conservés permettront de générer des allèles testables *in vivo*. Ces allèles modifiés devraient être placés de façon ectopique dans un contexte où les allèles

sauvages seraient exprimés de façon conditionnelle. Dans les conditions restrictives, le caractère essentiel pourra être observé.

4.1.2. Le locus *adnAB* est impliqué dans la réparation de l'ADN

Les deux gènes *adnA* et *adnB* sont conservés dans tous les génomes séquencés de *Streptomyces* ainsi que d'autres espèces d'actinomycètes. Une recherche de syntenie de la région contenant ce locus a révélé une conservation plus étendue : les deux gènes en amont d'*adnA* codent potentiellement une protéine membranaire et une méthyltransférase MGMT (6-O-méthylguanine DNA methyltransferase) et les deux gènes en aval d'*adnB* codent potentiellement une peptidase et une hydrolase à motif Nudix (figure 46). Cette organisation n'est pas conservée au-delà du genre *Streptomyces*. L'activité MGMT est connue pour jouer un rôle clé dans la réparation de l'ADN modifié par alkylation. Chez les mammifères, cette activité prévient le développement de lignées tumorales (Sekiguchi *et al.*, 1996; Tominaga *et al.*, 1997). L'hydrolase à motif Nudix serait capable d'hydrolyser la 8-oxo-dGTP, une forme prémutagène de la guanine. La déficience de cette activité est associée à un phénotype mutateur chez *E. coli* (Bhatnagar and Bessman, 1988; Ogawa *et al.*, 2005; Yoshimura *et al.*, 2007).



Figure 46. Organisation des gènes en amont et en aval d'*adnAB* chez *S. coelicolor*.

Les deux autres gènes conservés codent respectivement une protéine membranaire intégrale qui pourrait être impliquée dans différents processus cellulaires comme la transduction d'un signal et une peptidase qui pourrait participer à la maturation d'une enzyme ou d'une molécule signal. Ces spéculations restent à étayer : une analyse

fonctionnelle des protéines codées et des phénotypes associés à la mutation de ces gènes est envisagée. En premier lieu, il serait important de déterminer le profil de transcription de ces gènes : sont-ils induits lors d'un stress génotoxique comme le sont les gènes *adnAB* ? Comment sont-ils contrôlés ?

4.1.3. La réponse SOS est-elle indépendante de LexA chez les *Streptomyces* ?

Chez *E. coli*, le stress génotoxique induit une réponse cellulaire appelée réponse SOS (Radman, 1975). Sous le contrôle des acteurs RecA et LexA, jouant respectivement le rôle d'activateur et de répresseur, un ensemble de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et le cycle cellulaire est co-régulé.

Ce mécanisme existe-t-il chez les *Streptomyces* ? De nombreux homologues des gènes d'*E. coli* sont conservés chez les *Streptomyces*. Ainsi, RecA et LexA sont présents, de même que de nombreux gènes de la réparation de l'ADN. L'analyse *in vitro* a montré que la protéine LexA de *S. lividans* se fixe en amont de *recA* sur le motif 5'GAAC-N4-ATTC^{3'}. Ce dernier ressemble à la Cheo box de *B. subtilis*, rebaptisée SOS box (Cheo *et al.*, 1991; Vierling *et al.*, 2001). Ce promoteur n'est pas inductible par les dommages à l'ADN. Chez *M. tuberculosis*, la SOS box répond au consensus proche 5'GAAC-N4-GTTC^{3'} (Movahedzadeh *et al.*, 1997); une recherche de ce motif dans le génome de *S. coelicolor* a révélé 91 occurrences. Hormis devant les gènes *ruvABC*, *lexA* et *recA*, ce motif n'est pas trouvé devant des gènes dont la fonction serait liée à une réponse aux dommages à l'ADN. En revanche, parmi les produits codés, nombreux sont ceux qui présentent des hélices transmembranaires. Deux d'entre eux correspondraient à des facteurs sigma ECF (ECF pour Extracytoplasmic sigma Factor) qui sont généralement impliqués dans la réponse des stimuli environnementaux.

En revanche, le gène *recA* de *S. lividans* présente un second motif consensus dans sa région amont : 5'TTGTCAGTGGC-N6-TAGggT^{3'}. Ce dernier motif semble participer à

une réponse inductible par les agents génotoxiques mais de façon LexA-indépendant (Ahel *et al.*, 2002). Chez *S. ambofaciens*, nous avons montré au cours de ces travaux que les gènes *adnA* et *adnB* sont inductibles par les dommages à l'ADN. Ils pourraient donc appartenir à un réseau de gènes co-régulés en réponse aux dommages dans le génome. En amont de ces gènes a pu être identifié un motif caractérisé chez *M. tuberculosis*, 5'TGTC-12nt-TAnnnT3'. Ce motif est inclu dans la séquence identifiée en amont du gène *recA* et serait impliqué dans une réponse RecA indépendante au stress induit par la MMC (Gamulin *et al.*, 2004). Une analyse *in silico* révèle 128 occurrences de ce motif dans le génome de *S. coelicolor*. Lorsque la fonction des gènes potentiellement contrôlés est connue, elle est souvent associée à la réparation et la maintenance de l'ADN (tableau 5).

Ces résultats indiquent que chez les *Streptomyces*, la réponse aux stress génotoxiques pourrait être indépendante de LexA. Le régulon LexA quant à lui répondrait à des stimuli qui restent à explorer.

Une autre caractéristique a été relevée concernant la régulation du gène *adnB* : les consensus sont localisés à immédiate proximité des phases codantes prédites, à savoir 6 ou 7 nucléotides en amont du codon GTG ou ATG. Cette observation suggère que les transcrits de ces gènes sont dépourvus de région 5' non traduite (appelés 'leaderless'), et donc dépourvus du motif Shine-Dalgarno (SD, située 6 à 12 nucléotides en amont du codon d'initiation) permettant la fixation du ribosome sur l'ARN messenger. Ce mécanisme est répandu dans tout le règne du vivant. Chez les bactéries, alors qu'il est plutôt rare chez *E. coli*, il est fréquent chez les archées et chez les actinomycètes puisque 20% des gènes présenteraient cette caractéristique chez ces derniers (Zheng *et al.*, 2011).

Locus tag	Annotation	Fonctions
SCO1518-SCO1520	Opéron <i>ruvABC</i>	Impliqué dans l'étape post-synaptique de la RH
SCO1953	<i>uvrC</i>	Impliquées dans la réparation d'ADN par excision de nucléotides
SCO1958	<i>uvrA</i>	Impliquées dans la réparation d'ADN par excision de nucléotides
SCO1966	<i>uvrB</i>	Impliquées dans la réparation d'ADN par excision de nucléotides
SCO2064	<i>dnaE</i>	Sous-unité α de l'ADN polymérase III
SCO2468	<i>dnaG</i>	ADN primase, impliquée dans l'initiation de la réplication (<i>E. coli</i>)
SCO2737	<i>recG</i>	Impliquée dans la migration de la Croix de Holliday
SCO3351	<i>radA</i>	Impliquée dans la recombinaison
SCO4067	<i>dnaZ</i>	Sous-unité gamma et tau de la polymérase III
SCO4797	<i>uvrD1</i>	Impliquée dans NER (<i>M. tuberculosis</i>)
SCO5056	<i>xseA</i>	Exonucléase
SCO5183	<i>adnA</i>	Impliquées dans la maturation des extrémités de DSB de RH
SCO5184	<i>adnB</i>	Impliquées dans la maturation des extrémités de DSB de RH
SCO5769	<i>recA</i>	Impliquée dans la recombinaison homologue

Tableau 5. Extrait du régulon hypothétique impliqué dans la réparation ou la maintenance de l'ADN en réponse aux agents génotoxiques.

Le sens biologique de la traduction 'leaderless' reste hypothétique (Grill *et al.*, 2000). Cependant, il a été démontré que le ratio entre certains facteurs de la traduction (ex. IF2/IF3, IF pour Initiation Factor) pouvait moduler la traduction de ces transcrits. Chez *E. coli*, IF2 peut stimuler la traduction en favorisant la stabilité du complexe entre le ribosome et l'ARNt initiateur (Grill *et al.*, 2001) alors que IF3 a un effet négatif, probablement par déstabilisation de l'interaction entre codon et anticodon au niveau du codon d'initiation. Or, le ratio entre ces facteurs est modulé par des stimuli

environnementaux ; par exemple, le choc 'froid' favorise la synthèse d'IF2 (Jones *et al.*, 1987). Ainsi, l'initiation 'leaderless' pourrait permettre l'intégration de stimuli environnementaux.

4.2. Identification d'acteurs d'un mécanisme de recombinaison illégitime chez *S. ambofaciens* : implication dans la réparation des DSB

Les recherches *in silico* dans les génomes séquencés des *Streptomyces* ont permis d'identifier des acteurs potentiels d'un mécanisme Non Homologous End Joining-like, à savoir des protéines Ku-like ainsi que des ligases ATP dépendantes. Les homologues de ces deux acteurs sont impliqués dans la recombinaison NHEJ chez les eucaryotes, de même que chez les mycobactéries et *B. subtilis* où le NHEJ bactérien est le mieux caractérisé. L'existence de ce mécanisme de recombinaison illégitime est particulièrement intéressante dans le contexte des *Streptomyces* qui présentent des caractéristiques génétiques remarquables : (i) linéarité du chromosome, (ii) organisation génétique compartimentée, (iii) réarrangements génomiques fréquents et (iv) fort impact du transfert horizontal.

L'identification de ces acteurs suggère fortement qu'il existe un mécanisme NHEJ chez les *Streptomyces*. Cependant, l'origine et le rôle biologique des acteurs multiples restent à définir.

4.2.1. KuA et KuC sont impliquées dans la résistance aux stress génotoxiques

C'est chez les eucaryotes que le NHEJ a été caractérisé et étudié. Ainsi, les protéines Ku sous forme d'un hétérodimère Ku70/Ku80 sont capables de se lier aux extrémités d'ADN et de stimuler la réparation grâce à la Ligase IV. Chez la levure, la délétion des gènes *ku70* et *ku80* n'entraîne pas de sensibilité aux agents endommageant l'ADN, sauf dans un contexte *rad52*, déficient pour la RH. Ce résultat révèle probablement le fait que la RH compense la perte de viabilité due la déficience du NHEJ (Siede *et al.*, 1996). Chez les bactéries, la réparation de l'ADN par NHEJ est encore mal connue. Chez les mycobactéries, la mutation Δku confère une sensibilité aux radiations

ionisantes durant la phase stationnaire (Pitcher et al., 2007b). Alors que chez *S. coelicolor* A3(2) aucun phénotype de sensibilité aux UV n'avait été associé à la mutation des deux homologues chromosomiques *ku* (SCO0601, SCO5309) (Huang and Chen, 2006) et que la mutation de deux homologues *ku* (*ku1* SAV2945 et *ku2* SAV879) chez *S. avermitilis* confère une sensibilité légèrement accrue en réponse à EMS mais pas aux UV ni à la bléomycine (Zhang et al., 2012).

Chez *S. ambofaciens*, espèce modèle au laboratoire, 3 homologues *ku* ont été identifiés (*kuA*, *kuB* et *kuC*) dont un, *kuA*, est présent dans tous les génomes séquencés. Ce gène est co-localisé avec *polK* codant une sous unité polymérase. Les gènes *kuB* et *kuC* sont variables, c'est-à-dire retrouvés de façon non systématique. Ils sont par ailleurs souvent présents dans les régions terminales variables du chromosome ou sur des plasmides et donc susceptibles de subir des événements de transfert horizontal et d'avoir été acquis de la sorte.

Après avoir obtenu des lignées mutantes simples, doubles et triple pour les gènes *ku*, les phénotypes de sensibilité les plus marqués ont été révélés par l'utilisation de la MMC et des rayons électroniques. Ce rayonnement mime l'effet de rayons γ en produisant des DSB. Pour la première fois chez les streptomycètes, nous avons pu impliquer les protéines Ku dans la réponse au stress génotoxique. Ainsi, le mutant ΔkuA , et de façon plus originale et surprenante ΔkuC , confèrent une sensibilité au flux d'électrons. KuA apparaît comme l'acteur d'un mécanisme conservé chez tous les *Streptomyces*, et donc contribuant de façon importante à la biologie de la bactérie. KuC, par contre, participe à la résistance au stress génotoxique alors qu'appartenant aux gènes accessoires.

L'analyse du double mutant $\Delta kuAC$ montre que le phénotype de sensibilité aux rayons électroniques ne semble pas aggravé par rapport au simple mutant ΔkuA , ce qui

suggère que *kuA* et *kuC* forment un groupe épistatique. Les deux protéines pourraient alors fonctionner sous forme d'hétérodimère tout comme Ku70 et Ku80 chez les eucaryotes (Osipovich *et al.*, 1997). Des expériences d'interaction pourraient être envisagées pour tester cette hypothèse *in vivo* (double hybride) ou encore *in vitro* (co-immunoprécipitation, biacore).

Lorsque ces données sont mises en perspectives de l'origine exogène probable des gènes accessoires, il apparaît que grâce à l'acquisition de gènes, des lignées plus ou moins efficaces pour les mécanismes de recombinaison, pourraient être produites dans l'environnement. Il s'agirait alors de lignées mutatrices, dans le sens où elles seraient capables d'évoluer plus vite en produisant des variants à des fréquences variées. Dans le contexte de l'écosystème des *Streptomyces*, à savoir le sol, cette propriété leur permettrait de faire face aux fluctuations de l'environnement tant biotiques qu'abiotiques.

Quant à KuB, sa distribution est rare dans les 20 génomes disponibles, puisqu'outre *S. ambifaciens*, seul *S. coelicolor* présente un homologue. Il est probable que l'acquisition de cet allèle soit intervenue chez l'ancêtre commun de ces deux espèces phylogénétiquement proches. La mutation de ce gène n'a pas pu être associée à un phénotype de réponse aux agents génotoxiques. Son rôle et son impact restent inconnus.

Cependant, la mise en évidence de phénotype de sensibilité aux agents mutagènes ne démontre pas formellement l'implication des protéines Ku dans un mécanisme de réparation de l'ADN, et en l'occurrence des DSB. Elle n'exclut pas non plus leur implication dans d'autres phénomènes cellulaires. De même, il reste à montrer que la variabilité du nombre des allèles et de la nature des allèles influent effectivement sur les capacités de recombinaison.

Une approche de purification des protéines Ku et des tests *in vitro* permettra de vérifier leur affinité pour les extrémités d'ADN, et de tester la capacité de ces protéines à protéger l'ADN d'une dégradation exonucléasique. Ces tests sont en cours de réalisation en collaboration avec S. McGovern et F. Lecointe de l'unité MICALIS à Jouy-en-Josas.

Une approche fonctionnelle est actuellement développée au laboratoire pour tester l'implication des protéines Ku (et Lig, voir plus loin) dans la réparation des DSB. Pour cela, nous allons exprimer une endonucléase exogène (I-SceI originaire de la levure *S. cerevisiae*) de façon hétérologue chez *S. ambofaciens* et introduire dans le chromosome le site reconnu par cette endonucléase. La coupure par l'endonucléase va générer une DSB dont la réparation pourra être dépendante de la RH ou du NHEJ. Nous pourrions (i) impliquer les acteurs identifiés dans la réparation des DSB, et (ii) analyser le type de réparation illégitime dans différents contextes.

4.2.2. Les protéines Ku jouent-elles un rôle dans la protection des télomères chez les *Streptomyces* ?

Chez les eucaryotes, outre leur rôle dans le NHEJ, les protéines Ku jouent un rôle dans la protection de télomères. Elles protègent le télomère de la recombinaison inter-chromosomique et participe à la régulation de l'activité télomérasique (Riha *et al.*, 2006). L'inactivation de *ku* est associée soit au raccourcissement du télomère comme chez *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* et *Trypanosoma brucei* (Baumann and Cech, 2000; Boulton and Jackson, 1996; Janzen *et al.*, 2004) soit à son élongation comme chez *Arabidopsis thaliana* (Riha and Shippen, 2003). Chez l'Homme, les protéines Ku sont essentielles ; le caractère essentiel est dû à leur rôle dans la protection des télomères plutôt que dans le NHEJ (Wang *et al.*, 2009).

Il est tentant d'impliquer les protéines Ku dans le fonctionnement télomérique chez les *Streptomyces* malgré un fonctionnement télomérique distinct des cellules eucaryotes. La localisation cellulaire des protéines Ku pourrait être réalisée à l'aide de protéines de fusion (des souches portant une fusion Ku-eGFP ont été construites au laboratoire). Il est également envisageable de tester les interactions *in vitro* ou *in vivo* entre les protéines terminales, Tap et Tpg (Bao and Cohen, 2001, 2003) et les protéines Ku.

4.2.3. Caractérisation des homologues LigD

M. tuberculosis possède une ligase (LigD) multifonctionnelle, composée de plusieurs domaines : LigDom, NucDom et PolDom. La recherche d'homologues du domaine LigDom a permis d'identifier deux gènes codant un domaine ligase ATP dépendante : *ligC* et *ligD*. Le gène *ligC* appartient à un second locus conservé chez les *Streptomyces*. Ce locus est composé des gènes *ligC* et *polR*, codant respectivement une ligase ATP dépendante et une sous unité ADN polymérase. L'homologue LigD bien que plus fortement apparenté à MtuLigD est variable au sein des génomes des *Streptomyces*. Les gènes *ligD* et *kuC* montrent une co-occurrence (8/20 génomes dont 4 co-localisation) et une co-absence (6/20 génomes) significatives (figure 47). Par

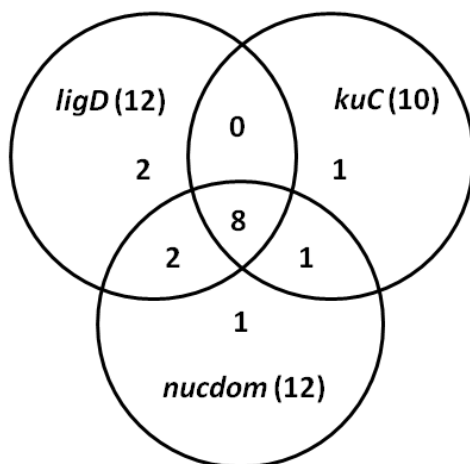


Figure 47 Représentation de la co-occurrence entre les gènes *kuC*, *ligD* et *nucdom* dans les génomes de *Streptomyces*.

kuC et *ligD* sont co-occurents dans 8 génomes ;
kuC et *nucdom* sont co-occurents dans 9 génomes ;
ligD et *nucdom* sont co-occurents dans 10 génomes ; les trois gènes sont co-occurents dans 8 génomes.

ailleurs, un seul locus homologue du domaine NucDom de MtuLigD a été identifié. Ce locus est présent dans 12 génomes sur 20 analysés, co-occurent avec *ligD* dans 50% des cas et co-absent dans 6 cas sur 20. Ainsi, ces trois gènes *kuC*, *ligD* et *nucdom* pourraient fonctionner de concert dans la réparation de l'ADN.

Nous pourrions donc être en présence de deux systèmes NHEJ redondants ou chevauchants. Cette hypothèse est appuyée par le phénotype aggravé de la double mutation $\Delta ligCD$ par rapport aux mutations simples. Les loci *kuA-polK* et *ligC-polR* étant conservés, le NHEJ codé par *ligD-kuC* (et potentiellement *nucdom*) pourraient avoir été acquis ou perdus sporadiquement à partir de l'ancêtre commun.

Les perspectives immédiates sont de valider *in vitro* le caractère fonctionnel de ces acteurs. Des expériences biochimiques mises en place avec F. Lecointe (INRA MICALIS, Jouy-en-Josas) consistent à reconstituer les différents complexes afin de tester la stimulation de la religation d'extrémités d'ADN. Le rôle des sous-unités polymérase sera également testé lors de ces expériences.

4.3. Compétition entre RH et NHEJ chez *Streptomyces*

Les eucaryotes et certains procaryotes possèdent simultanément les deux mécanismes de réparation des DSB : la recombinaison homologe et le NHEJ. Comment le choix entre les deux mécanismes est-il régulé ?

Selon les espèces, le type cellulaire ou encore la phase du cycle cellulaire, les deux mécanismes ont un rôle variable. Ainsi, la RH joue un rôle dominant chez la levure tandis que le NHEJ est plus utilisé chez les eucaryotes supérieurs. Chez la levure, la RH est plus efficace dans les cellules diploïdes que dans les lignées haploïdes. Dans les cellules B de poulet et les lignées embryonnaires de souris, la RH est prépondérante alors que l'inverse est observé dans les autres lignées. Enfin, la RH est stimulée lorsque la chromatide sœur est présente dans les cellules (phases S et G₂) alors que le NHEJ est constant tout au long du cycle cellulaire.

4.3.1. RH et NHEJ : entre collaboration et compétition chez les eucaryotes

Chez les eucaryotes, le choix entre les mécanismes de réparation des DSB est régulé par différents facteurs dont l'un est la nature de la lésion. En effet, c'est le type de DSB et la façon dont les cassures sont générées qui orientent la cassure vers une voie de réparation spécifique. Par exemple, les DSB générées pendant la recombinaison V(D)J sont réparées *via* le NHEJ (Dudley *et al.*, 2005). Cependant, celles formées par Spo11 durant la méiose sont réparées par la RH (Cole *et al.*, 2010) : Spo11 forme une liaison covalente avec l'ADN ; cette liaison favorise le recrutement du complexe MRX/Sae2, acteurs pré-synaptiques de la RH.

En outre, les mécanismes RH et NHEJ sont synergiques dans la prise en charge des DSB. Chez la souris, les deux systèmes sont essentiels pendant l'embryogenèse. La mutation des acteurs de l'un ou de l'autre est létale : Rad51, BRCA2 et XRCC2 pour la RH ou ligase IV, XRCC4 pour le NHEJ. Un autre exemple souligne la caractère

indispensable et complémentaire des deux systèmes pour l'intégrité génomique : dans le cerveau en développement, l'apoptose est provoquée par la perturbation de la RH au début des phases prolifératives, et par l'inactivation du NHEJ pendant les phases post-mitotiques (Oarii *et al.*, 2006).

L'analyse de mutants affectant à la fois les acteurs de la RH et du NHEJ apportent également des preuves de leur collaboration. Chez la souris, la mutation de Rad54 (RH) ou de Ku80 (NHEJ) sont viables alors que le double mutant présente une survie plus faible et une sensibilité élevée aux radiations ionisantes (Couëdel *et al.*, 2004).

Bien que la collaboration entre les RH et NHEJ soit nécessaire pour le maintien de l'intégrité du génome, leur concurrence est également évidente. Cette compétition est la plus manifeste chez les mutants qui affectent soit l'un soit l'autre des mécanismes.

Chez la levure, la déficience en protéines Ku oriente la réparation des DSB vers la RH (Lee *et al.*, 1998 ; Kretzschmar *et al.*, 2013) probablement parce que Ku bloque physiquement l'accès de la machinerie RH aux extrémités d'ADN. De même, le complexe Dnl4-Lif1 (homologues ligase IV/XRCC4) exerce un effet inhibiteur sur le processus pré-synaptique de la RH, possiblement en stabilisant les protéines Ku aux extrémités d'ADN (Zhang *et al.*, 2007). Ce phénomène est observé également chez les eucaryotes complexes (Fukushima *et al.*, 2001). Par ailleurs, les protéines Ku pourraient bloquer l'accès à d'autres mécanismes de réparation des DSB. En effet, lors du développement embryonnaire chez la souris, une mutation affectant le complexe ligase IV/XRCC4 est létale tandis que le mutant Δku est viable (Couëdel *et al.*, 2004; Vogel *et al.*, 1999). Cependant, la survie du mutant *ligaseIV/XRCC4* est restaurée par une déficience des protéines Ku, suggérant que Ku pourrait inhiber d'autres mécanismes de réparation même si le NHEJ n'est pas opérationnel (Karanjawala *et al.*, 2002).

Réciproquement, l'augmentation de la prise en charge par le NHEJ n'est observée que lorsque les extrémités d'ADN ne sont pas maturées par les enzymes pré-synaptiques (Stark *et al.*, 2004). Cela est renforcé par des analyses des mutants dans lesquels la maturation des extrémités est fortement gênée : ces mutants délétés pour *sae2* (nucléase) ou inactivant CtIP qui stimule la maturation des extrémités de DSB (Sartori *et al.*, 2007) provoquent une augmentation de l'intervention du NHEJ (Bennardo *et al.*, 2008; Huertas *et al.*, 2008; Yun and Hiom, 2009). De même, lorsque la protéine synaptique Rad51 ne peut accéder aux extrémités d'ADN, alors une augmentation de prise en charge par la recombinaison illégitime (SSA) est observée (Dronkert *et al.*, 2000; Ivanov *et al.*, 1996; Stark *et al.*, 2004; Tutt, 2001).

4.3.2. Et chez les bactéries ?

Chez les bactéries, très peu de choses sont connues sur l'équilibre entre RH et NHEJ. La présence du NHEJ semble être associée à l'existence d'une phase du cycle de développement bactérien où un seul exemplaire du chromosome est présent dans les cellules. Il s'agit soit d'organismes passant de très longues périodes en phase stationnaire ou expérimentant des conditions environnementales extrêmes (ex. dessiccation) soit d'organismes formant des spores (formes de résistance et de dissémination). Chez ces organismes, la RH prendrait préférentiellement en charge les DSB formées durant la phase végétative (réplication intensive) et le NHEJ trouverait son rôle durant les phases où une seule copie du génome est présente. Chez les *Streptomyces*, l'apparition des mutants dépigmentés durant la phase stationnaire de croissance pourrait alors s'expliquer par une prise en charge préférentielle des DSB par le NHEJ et par les réarrangements chromosomiques qui en découleraient. Une prise en charge prédominante des DSB par la RH permettrait d'éviter que des réarrangements délétères ne se forment. Ainsi, chez *M. smegmatis*, la RH serait

environ 3,5 fois plus efficace que le NHEJ pour la réparation des DSB (Gupta *et al.*, 2011).

La compétition entre RH et NHEJ est également observée chez les bactéries. Ainsi, chez *M. tuberculosis*, la fréquence de RH augmente lorsque *ku* est muté mais pas lorsque *ligD* l'est (Gupta *et al.*, 2011). *In vitro*, Ku est capable de protéger l'extrémité de l'ADN double brin de la dégradation par AdnAB (Sinha *et al.*, 2009). Cette observation est cohérente avec les résultats obtenus chez la levure suggérant que la fixation de Ku pourrait bloquer l'accès aux extrémités d'ADN. Cette relation semble non réciproque chez les mycobactéries ; ainsi, l'inactivation de la RH (mutation *recA*) n'induit pas l'augmentation de la fréquence de NHEJ (Gupta *et al.*, 2011). Ainsi, l'impact délétère de la réparation mutagène dépendant du NHEJ pourrait être contenu. Il faut souligner qu'un troisième mécanisme de réparation des DSB a été identifié chez les mycobactéries : il s'agit du mécanisme SSA (une voie de la recombinaison homologue utilisant une séquence répétée comme matrice donc ne nécessitant pas de chromosome homologue d'ADN) dépendant du complexe RecBCD. La relation entre RH et SSA est également asymétrique : en effet, la déficience du SSA chez un mutant *recBCD* est associée à l'augmentation de la RH. En revanche, l'inactivation de la RH ne provoque pas l'augmentation de SSA. L'ensemble de ces phénomènes renforce l'idée que la RH est une voie prédominante pour la réparation des DSB chez les mycobactéries.

Chez *S. avermitilis*, la délétion des 2 gènes *ku* (*ku1* et *ku2*) augmente l'efficacité de la recombinaison homologue (Zhang *et al.*, 2012). Cette donnée tend à conforter les résultats obtenus chez les mycobactéries. En revanche chez *S. ambofaciens*, la présence de deux copies d'*adnAB* provoque une augmentation légère de la sensibilité à la MMC des spores de *S. ambofaciens*. Ce résultat pourrait appuyer l'hypothèse selon laquelle AdnAB inhiberait le fonctionnement du NHEJ.

4.4. Recombinaison et évolution du génome des *Streptomyces*

En conclusion des résultats acquis au cours de ce travail, il est possible de proposer un modèle intégrant les mécanismes de RH et de NHEJ dans la prise en charge des DSB tout au long du cycle biologique des *Streptomyces*. Dans la phase exponentielle, la RH joue un rôle majeur dans la réparation des DSB, notamment générées au cours de la réplication chromosomique. Durant la même phase, *kuA* est faiblement exprimé permettant la mise en œuvre de la réparation non mutagène des DSB. L'activité AdnAB, majeure pour l'entrée en RH (étape pré-synaptique) est strictement régulée afin de permettre la maturation des extrémités des DSB tout en évitant la dégradation excessive de l'ADN. Les sites *chi*, dont l'existence et la nature restent à identifier, seraient répandus dans le chromosome avec une densité croissante vers les extrémités. Ils assurent le caractère ménagé de la dégradation par AdnAB. L'absence de ces sites sur l'ADN exogène favoriserait en revanche la dégradation d'ADN entrant. La surexpression d'*adnAB* (lorsque 2 copies sont présentes) impacte l'efficacité de la RH en augmentant la dégradation de l'ADN chromosomique et se traduit par une instabilité génétique accrue. Lorsque la cellule rentre en phase stationnaire et lors de la maturation des endospores, le NHEJ serait activé grâce à l'induction de l'expression de *kuA* et *ligC*. La prise en charge des DSB pendant cette phase permettrait de pallier l'absence de chromatide homologue. En revanche, ce mode de réparation est mutagène, et expliquerait l'apparition à haute fréquence (circa 1%) de mutants présentant des réarrangements de grande ampleur (délétion, translocation, fusion) dans les régions terminales du chromosome, en conditions de laboratoire. En revanche, la protection des extrémités d'ADN conférée par ce complexe limiterait la dégradation dépendant d'AdnAB et permettrait le maintien à court terme puis l'intégration d'information exogène. L'insertion préférentielle d'ADN dans les régions terminales serait le moteur de la diversification du génome des *Streptomyces*.

Le gradient d'insertion-délétions (indels) dans les régions terminales du chromosome, aussi appelée synthénie dégénérée (Choulet *et al.*, 2006; Thibessard and Leblond, 2014), pourrait résulter (i) d'une fréquence de DSB croissante en direction des extrémités du chromosome ; et/ou (ii) d'une prise en charge des DSB à l'avantage du NHEJ dans les régions terminales.

Les DSB recombinogènes pourraient être causées préférentiellement par l'arrêt de la fourche de réplication (Michel *et al.*, 1997). Chez *E. coli*, ces DSB sont connues pour stimuler l'instabilité génomique (Michel *et al.*, 2001). Les arrêts de la fourche de réplication pourraient-ils être plus fréquents à mesure que celle-ci s'approche des extrémités chez *Streptomyces* ? Chez *E. coli* et *B. subtilis*, la fixation des protéines Tus sur les sites *ter* est responsable de l'arrêt spécifique de la fourche de réplication dans le processus de terminaison de la réplication (Neylon *et al.*, 2005). Cependant, l'existence d'un mécanisme de terminaison de la réplication chez les *Streptomyces* reste à identifier, si tant est que ce dernier existe, compte tenu de la configuration linéaire du chromosome et de la présence de termini 'naturels' que constituent les télomères.

A défaut de mécanisme de terminaison, Hendrickson and Lawrence (2006) ont décrit un motif octamérique 5'TGGGGGAG3' dans le génome de *S. coelicolor* dont la polarité est analogue à celle des sites *chi* d'*E. coli* (5'GCTGGTGG3'). Chez *E. coli*, plus de 75% de ces motifs sont orientés en direction de l'origine de réplication. Cette orientation permet de réguler l'activité RecBCD à partir d'une DSB formée au cours de la réplication et conséquemment d'initier un événement de RH réparateur de la fourche cassée (Kowalczykowski, 2000). Bien que le caractère fonctionnel du motif 5'TGGGGGAG3' n'ait pas été établi, il est tentant d'imaginer qu'il s'agisse de l'analogie fonctionnel des sites *chi*. Dans ce cadre, il est intéressant de noter que la distribution

de ces motifs augmente vers les extrémités du chromosome linéaire, ce qui créditerait l'hypothèse d'une augmentation de la fréquence des DSB dans les régions terminales.

D'autres sources de DSB correspondent aux éléments génétiques mobiles dont la densité augmente dans les régions terminales ou à l'action de certains métabolites secondaires produits en phase tardive de croissance et susceptibles d'endommager l'ADN (Xu *et al.*, 1994).

La réparation des DSB peut par ailleurs être différentielle le long du génome et produire un gradient de réarrangements. Hormis les télomères dont le timing de réplication reste inconnu, il est vraisemblable que les extrémités du chromosome se répliquent plus tardivement que la région centrale. Ainsi, du fait de la ré-initiation de la réplication, une cassure engendrée à proximité de l'origine sera plus favorablement réparée par RH que si elle est formée dans les régions terminales. Par ailleurs, chez la levure, il a été montré qu'alors que la fréquence du NHEJ est constante le long du chromosome celle de la RH augmente progressivement vers les extrémités chromosomiques (Ricchetti *et al.*, 2003). Cela suggère que l'efficacité des mécanismes de réparation des DSB est variable selon la localisation chromosomique. De façon intéressante, la réparation des DSB par NHEJ s'accompagne d'insertions de séquence d'ADN mitochondrial. Ainsi, les DSB correspondent à des sites d'intégration de matériel qui pourrait être exogène. Cette situation est similaire à celle identifiée chez *Streptomyces*. Le gradient d'indels (régions d'ADN variables contenant de 1 à 10 gènes) pourrait ainsi résulter de la réparation de DSB, et refléter l'insertion d'ADN acquis par transfert horizontal.

5. Perspectives

Ce travail a permis d'initier l'exploration des mécanismes de réparation des cassures double brin chez *Streptomyces*. L'intégration des premières connaissances permet de tirer une hypothèse permettant de relier ces mécanismes avec la plasticité et l'évolution du génome.

Pour autant, il reste de nombreux travaux à réaliser pour comprendre ces mécanismes et leur rôle respectif dans la prise en charge des DSB. Ainsi, l'implication d'AdnAB dans la recombinaison homologue reste à démontrer, de même que reste à établir la raison de son caractère essentiel. Par ailleurs, le mécanisme NHEJ est à peine esquissé par analogie avec les mycobactéries et *B. subtilis*, mais de très nombreuses originalités caractérisent les acteurs identifiés chez les *Streptomyces* ; la perspective la plus intrigante étant l'implication de gènes accessoires dans la capacité à réparer et donc à intégrer de l'ADN exogène. Il reste néanmoins à démontrer l'existence de la réparation des DSB par le NHEJ ; le système I-SceI mis en œuvre actuellement dans l'équipe sera décisif dans ce sens. Enfin, les différents contextes génétiques construits dans ce travail permettront d'estimer la prise en charge des DSB le long du génome et de tester l'hypothèse du gradient de recombinaison qui pourrait être à l'origine de la diversification du génome et de son organisation compartimentée si remarquable.

MATERIEL ET METHODES

6. Matériel et Méthodes

6.1. Souches bactériennes, plasmides et BAC

6.1.1. Souches bactériennes

Les souches utilisées dans ce travail sont listées dans le tableau 6. La souche d'*E. coli* DH5 α est employée comme hôte pour la propagation des plasmides et des BAC. Les constructions pour les expériences de complémentation des différents mutants sont réalisées avec la souche d'*E. coli* SURE (Stratagène). L'étape de remplacement de séquence au sein des BAC sauvages ou des plasmides par le processus de PCR-targeting est effectuée grâce à les souches d'*E. coli* BW25113-pKD20 ou DY330. Les souches d'*E. coli* ET12567-pUZ8002 ou S17-1 permettent de réaliser les expériences de conjugaison inter-générique avec *Streptomyces*. Les souches d'*E. coli* JJC40 et JJC315 sont utilisées pour les tests de viabilité et de sensibilité aux UV.

6.1.2. Plasmides

Le plasmide pSET152 (figure 48A) est un vecteur intégratif d'une taille de 5,5 kb. Il porte un gène de résistance à l'apramycine (*aac(3)IV*) et une origine de transfert (*oriT*) de type RK2. La présence du site d'attachement (*attP*) et du gène codant l'intégrase (*int*) du phage Φ C31 permet son intégration au site *attB* chromosomique de *Streptomyces*. Ce vecteur porte un site multiple de clonage dans le gène *lacZ α* permettant les expériences d' α -complémentation.

Le plasmide pSPM88T est dérivé du plasmide pOSV234 au sein duquel une origine de transfert a été ajoutée entre le gène de résistance à l'apramycine *aac(3)IV* et le site *attR* (Chipot, 2007). Le plasmide pOSV234 (figure 48B) a été fourni par J.-L. Pernodet (IGM, Orsay), portant les gènes de résistance à l'ampicilline et à

l'apramycine et une origine de réplication. Ce dernier est flanqué des sites *attL* et *attR* de l'élément pSAM2 (Raynal *et al.*, 2006).

Le plasmide pOSK1112 (figure 48C) porte les gènes de résistance à l'ampicilline (*amp*) et au thiostrepton (*tsr*) permettant le maintien de ce plasmide chez *E. coli* et *Streptomyces* respectivement. Ce vecteur porte également les gènes *xis* et *int* de l'élément pSAM2 qui permettent l'excision de la cassette de mutagenèse par recombinaison site-spécifique entre les sites *attL* et *attR* ainsi qu'une origine de transfert de type RK2 (*Pac oriT*) qui permet la mobilisation en *trans* de ce plasmide.

Le plasmide pIJ6902-LCN, dérivé du plasmide pIJ6902, a une taille de 10,9kb. Il porte le gène *aac(3)IV*, une origine de transfert de type RK2 ainsi qu'un promoteur pTipA inducible au thiostrepton en amont de la cassette de clonage permettant l'expression chez *E. coli* (figure 48D). De plus, il possède une région limitant à 4-6 son nombre de copies par cellule grâce à une origine de réplication (*ori2*) provenant de plasmide pBeloBAC 11 et dérivée de facteur F (New England Biolabs).

Le plasmide pKD20 (figure 48E), d'une taille de 6078 pb, porte un gène de résistance à l'ampicilline (*bla*) et les gènes *gam*, *bet* et *exo*, codant le système de recombinaison λ RED, sous le contrôle d'un système d'expression inducible à l'arabinose (*ParaB*, *Pc* et *araC*). Le système de recombinaison λ RED augmente l'efficacité de la recombinaison homologue impliquant des extrémités double-brin même en présence de courtes homologues (25-50 pb) (Murphy, 1998). L'origine de réplication de ce plasmide (*oriR101*) est sous le contrôle d'une protéine thermosensible (RepA101ts) qui permet la réplication du plasmide au sein de la souche *E. coli* BW25113 à 30°C mais pas à 37°C.

Le plasmide pUZ8002 porte un gène de résistance à la kanamycine et les fonctions nécessaires à la mobilisation en *trans* d'un plasmide porteur d'une origine de transfert de type RK2.

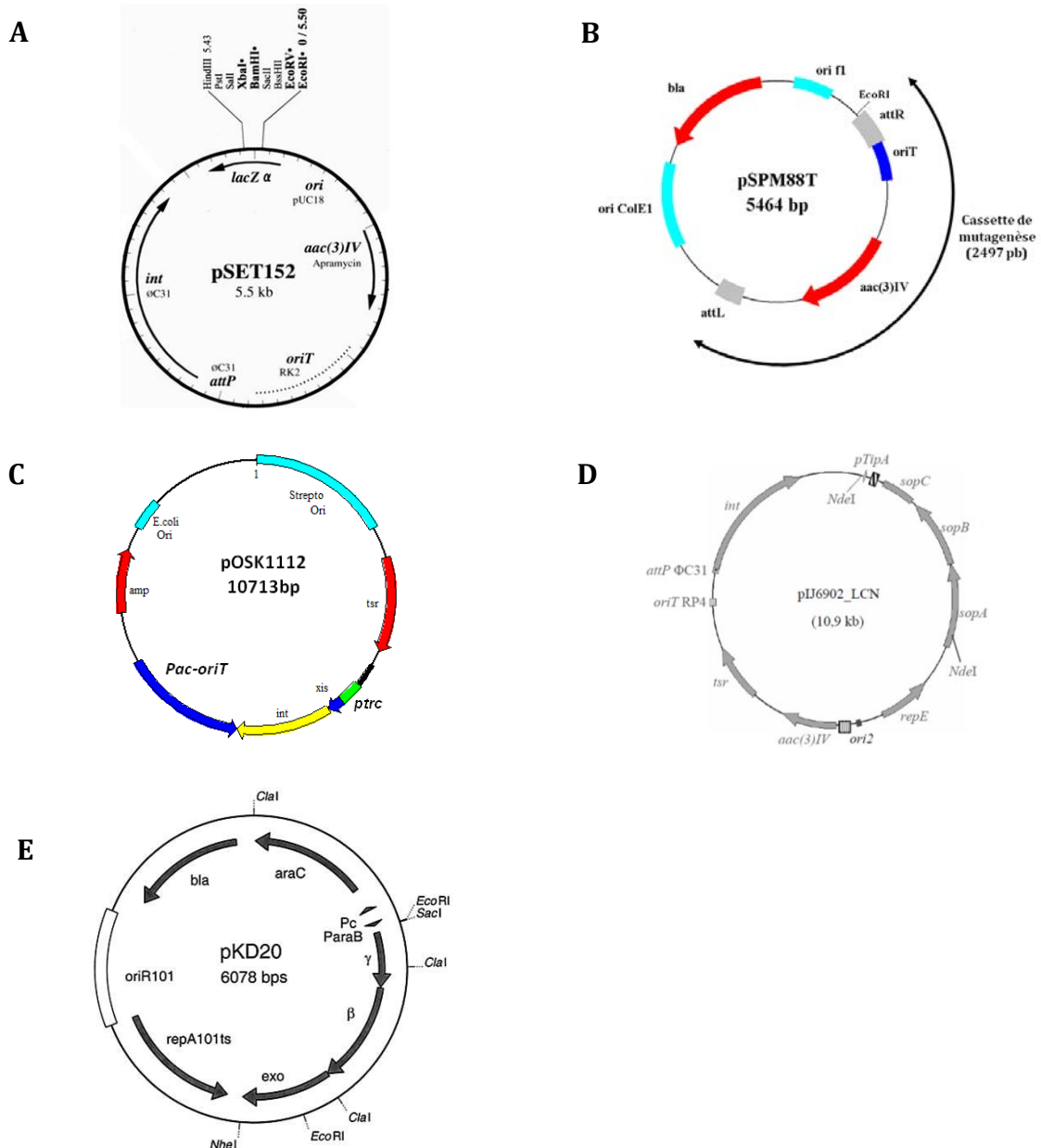


Figure 48 Cartes des plasmides

A : Carte du plasmide pSET152. *oriT* : origine de transfert de type RK2 ; *ori* : origine de répliation du plasmide pUC18 ; *aac(3)IV* : gène de résistance à l'apramycine ; *int* : gène codant l'intégrase du phage ϕ C31 ; *attP* : site d'attachement du phage ϕ C31 ; *lacZ α* : gène codant le peptide α permettant l' α -complémentation.

B : Carte du plasmide pSPM88T. *bla* : gène de résistance à l'ampicilline ; *aac(3)IV* : gène de résistance à l'apramycine ; *Ori f1* : origine de répliation du phage f1 ; *attL* et *attR* : sites de recombinaison de l'élément pSAM2 ; *oriT* : origine de transfert ; *ori colE1* : origine de répliation du plasmide colE1 ; cassette de mutagenèse : fragment amplifié pour la mutagenèse.

C : Carte du plasmide pOSK1112. *ori Strepto* : origine de répliation fonctionnelle chez *Streptomyces* ; *ori E. coli* : origine de répliation chez *E. coli* ; *amp* : gène de résistance à l'ampicilline ; *tsr* : gène de résistance au thiostrepton ; *ptrc* : promoteur *trc* d'*E. coli* ; *xis* et *int* : gènes codant respectivement l'excisionase et l'intégrase de l'élément pSAM2.

D : Carte du plasmide pIJ6902-LCN. *aac(3)IV* : gène de résistance à l'apramycine ; *tsr* : gène de résistance au thiostrepton ; *oriT RP4* : origine de transfert de type RK2 ; *attP ϕ C31* : site d'attachement du phage ϕ C31 ; *int* : gène codant l'intégrase du phage ϕ C31 ; pTipA : promoteur inductible au thiostrepton ; *sopABC* : locus codant un système de partition ; *ori2* : origine de répliation de facteur F à faible nombre de copies (4 à 6 par cellule) ; *repE* : gène codant la protéine de répliation.

E : Carte du plasmide pKD20. *Bla* : gène de résistance à l'ampicilline ; *gam*, *bet* et *exo* : gènes codant le système de recombinaison λ RED ; *ParaB*, *araC* et *Pc* : Système d'expression induit par l'arabinose ; *repA101ts* : origine de répliation thermosensible chez *E. coli* ; *oriR101* : origine de répliation chez *Streptomyces*.

6.1.3. BAC (Bacterial Artificial Chromosome)

Les BAC BAB15ZE8, BAA16ZB5, BAB6ZC3, BAB27ZF1, BAB11ZA3, BAA4ZD4, respectivement porteur du locus *adnAB*, *kuA*, *kuB*, *kuC*, *ligC* et *ligD*, sont issus d'une banque d'ADN génomique de *S. ambofaciens* ATCC23877 réalisée dans le BAC pBeloBAC11 (New England Biolabs) qui confère la résistance au chloramphénicol (Choulet *et al.*, 2006). Le gène de résistance au chloramphénicol des BAC utilisés dans ce travail est remplacé par le gène de résistance à la kanamycine car *Streptomyces* est naturellement résistant au chloramphénicol.

6.1.4. Cosmides

Le cosmide pWED2 est un vecteur d'une taille de 5,6kb. Il porte les gènes de résistance à la puromycine (*pac*) et à l'ampicilline (*bla*) et une origine de transfert de type RK2 (figure 49).

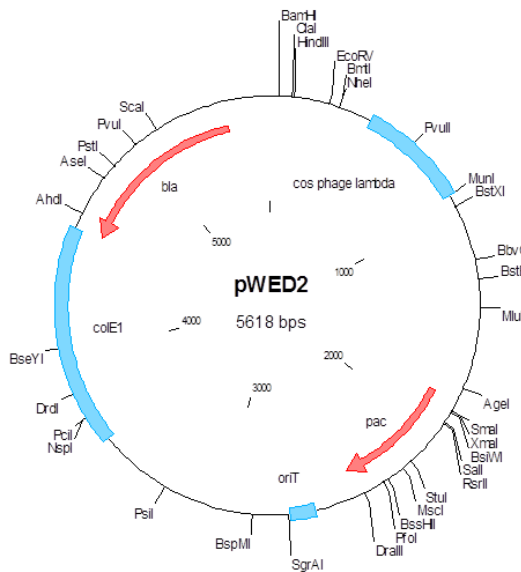


Figure 49 Carte de pWED2

bla: gène de résistance à l'ampicilline ; *colE1* : origine de réplication du plasmide *colE1* ; *oriT* : origine de transfert de type RK2 ; *pac* : gène de résistance à la puromycine ; *cos phage λ* : séquence pour l'introduction du cosmide dans le phage.

Pour la construction de mutants de *S. coelicolor*, les dérivés du cosmide recombinant 2St3B6 portant un transposon Tn5062 inséré dans le gène *adnA* ou *adnB* de *S. coelicolor* M145 sont utilisés. Ces cosmides sont fournis par Pr. Paul Dyson, Université de Swansea (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>)

6.2. Condition de cultures

Les compositions des milieux de culture utilisés sont détaillées dans le tableau 7. Tous ces milieux sont autoclavés pendant 20 minutes à 120°C.

Les souches d'*E. coli* sont cultivées dans le milieu LB à 37°C, à l'exception des souches BW25113-pKD20 et DY330 cultivées à 30°C. Le milieu SOC est utilisé après l'électroporation d'*E. coli* lors de la régénération des cellules.

Les souches de *S. coelicolor* A3(2) et *S. ambofaciens* ATCC23877 sont cultivées à 30°C sur milieu SFM pour la sporulation ou HT liquide lors de l'établissement des courbes de croissance de *Streptomyces* ainsi que pour les extractions des ARN. Le milieu 2YT est utilisé lors des conjugaisons inter-génériques.

La collecte des spores des souches sauvage et mutantes de *Streptomyces* est réalisée à partir de tapis bactériens après une incubation à 30°C pendant 5 jours.

6.3. Construction des plasmides, cosmide et BAC recombinants

6.5.1. Les constructions pour la mutagenèse

Le cosmide pNSV005 a été réalisée pour la délétion du locus *adnAB* de *S. ambofaciens* ATCC23877. Les régions d'ADN en amont (Région U-*adnAB*, 1,5 kb) et en aval (Région D-*adnAB*, 1,8 kb) des gènes *adnAB* ont été amplifiées par LR-PCR (Long-Range PCR) en utilisant respectivement l'ADN génomique de *S. ambofaciens* ATCC23877 comme matrice et les amorces V1_U-AdnABf/V1_U-AdnABr et V1_D-AdnABf/ V1_D-AdnABr (figure 50 et 51).

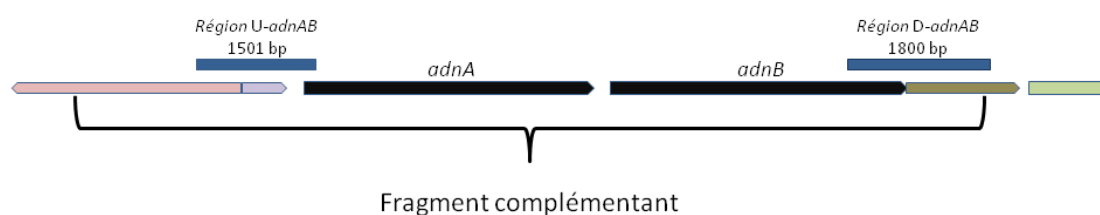


Figure 50. Organisation du locus *adnAB* de *S. ambofaciens*

Les régions en amont (Région U-*adnAB*) et en aval (Région D-*adnAB*) d'*adnAB*, clonées en vue des tentatives de délétion d'*adnAB* sont représentées par les rectangles bleus. Le fragment complémentant (11,5 kb) correspond au fragment *NcoI* cloné dans pSET152 pour les expériences de complémentation.

Ces deux régions ont été respectivement clonées dans le plasmide pGEM®-T et puis libérées par les enzymes de restriction (*HindIII/EcoRV* ou *EcoRV/NheI* respectivement). La cassette excisable *att3aac* du plasmide pOSV234 conférant la résistance à l'apramycine a été obtenue par la digestion par *EcoRV*. Les trois fragments décrits dessus ont été ligués simultanément dans le vecteur pWED2 digéré par *HindIII/NheI*.

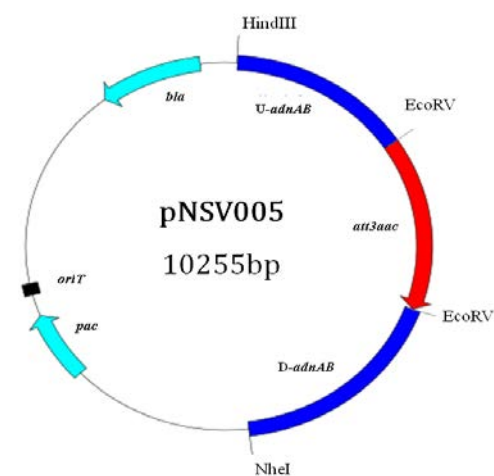


Figure 51. Carte de pNSV005

U-*adnAB* : région en amont du gène *adnA*; D-*adnB* : région en aval du gène *adnB*; *att3aac* : cassette excisable conférant la résistance à l'apramycine; *pac* : gène de résistance à la puromycine; *bla* : gène de résistance à l'ampicilline; *oriT* : origine de transfert de type RK2

Les BAC recombinants pour construire les simples mutants de *S. ambofaciens* $\Delta adnA$, $\Delta adnB$, ΔkuA , ΔkuB , ΔkuC , $\Delta ligC$, $\Delta ligD$, les doubles mutants $\Delta kuAB$, $\Delta kuAC$ et le triple mutant $\Delta kuABC$ ont été créés par PCR-targeting (figure 52). Pour cela, les BAC sauvages ou mutés ont été introduits respectivement, par transformation, chez *E. coli* DY330 qui possède le système λ RED (*gam*, *bet*, *exo*) favorisant la recombinaison homologue avec l'ADN linéaire. Puis, une amplification par PCR a été réalisée sur la matrice pSMP88T. Les amorces utilisées au cours de cette amplification (tableau 8) ont été dessinées avec des extensions en 5' correspondant aux régions flanquant le gène à déléter. Les amplifiats ainsi obtenus ont été introduits indépendamment dans la souche BW25113-pKD20 portant le BAC adéquat par transformation. Une sélection des transformants sur apramycine

permet de sélectionner les BAC recombinants mutés pour le gène ciblé. Des vérifications ont été réalisées par PCR.

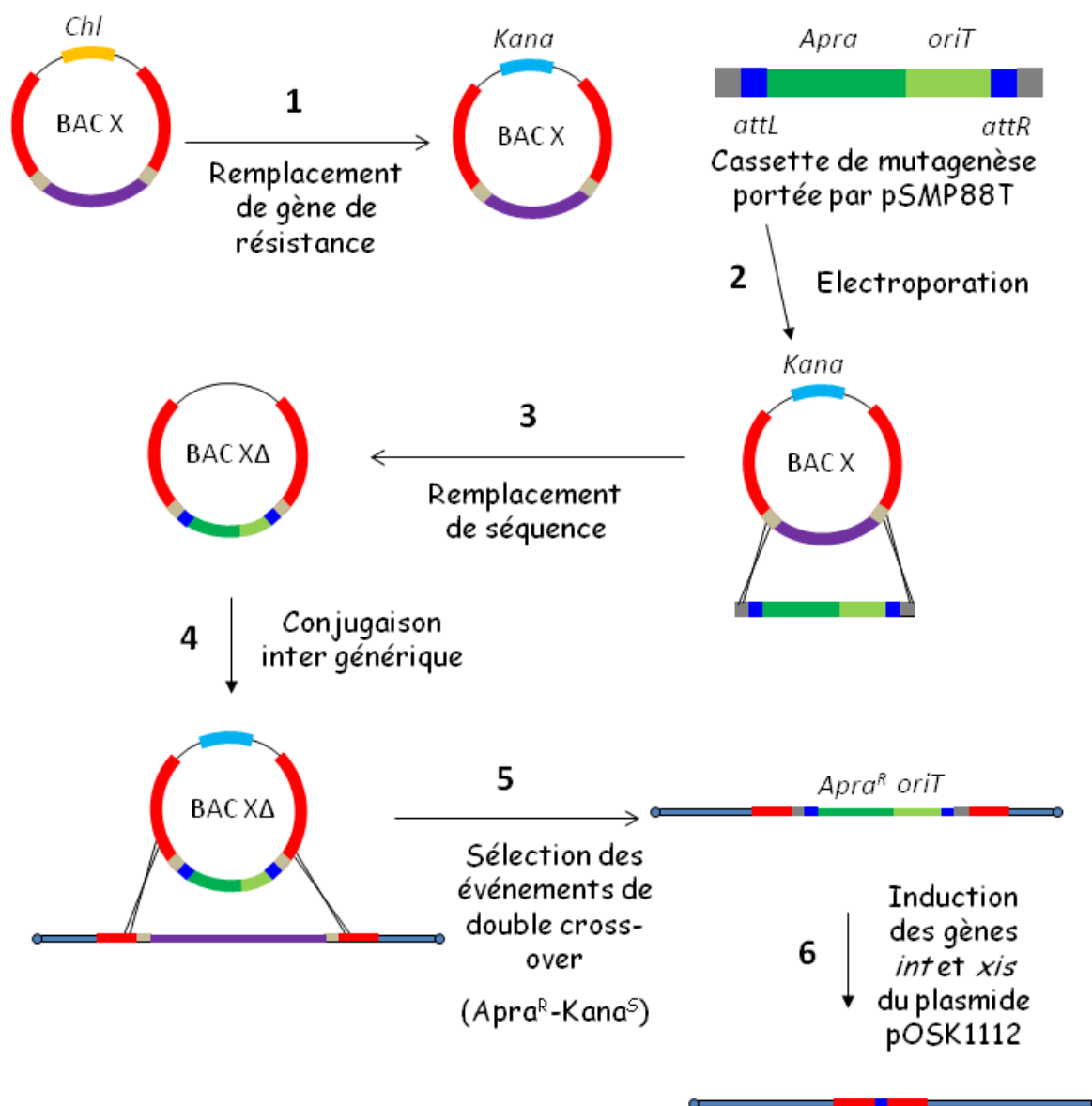


Figure 52. Schéma général de la stratégie expérimentale de mutagenèse.

Les grandes étapes sont symbolisées par des flèches. Les chiffres indiquent le numéro de l'étape. X : nom du BAC recombinant empolyé. XΔ : BAC recombinant délété du locus ciblé. En violet : loci à déléter. La cassette de mutagenèse porte les séquences homologues (en gris), les sites *att* (en bleu foncé), le gène conférant la résistance à l'apramycine (en vert foncé) et l'origine de transfert (en vert clair). En rouge : le segment d'ADN du chromosome flanquant le locus ciblé permettant la recombinaison homologue entre le BAC délété et le chromosome. En jaune et bleu clair sont représentés les gènes conférant respectivement la résistance au chloramphénicol et à la kanamycine. Cette stratégie est aussi utilisée pour d'autre processus de mutagenèse.

6.5.2. Les plasmides recombinants pour les expériences de complémentation

Le plasmide de complémentation pSET152-*adnAB* a été construit par clonage. Un fragment *NcoI* de 11,5 kb contenant le locus *adnAB* et provenant du BAC BAB15ZE8 a été cloné dans le vecteur pSL1180. Puis, un fragment *XbaI-EcoRI* de 11,5 kb contenant le locus *adnAB* issu de ce vecteur recombinant a été ligué dans le vecteur intégratif pSET152 digéré pour générer le plasmide pSET152-*adnAB*.

Les plasmides pSET153 et pSET153-*adnAB* ont été respectivement créés à partir de pSET152 et pSET152-*adnAB*. Le gène *neo* conférant la résistance à la kanamycine amplifié par PCR sur le cosmide SuperCos1 avec les amorces KanDApr_f/KanDApr_r est utilisé pour remplacer le gène de résistance à l'apramycine des plasmides pSET152 et pSET152-*adnAB* par PCR-targeting. La sélection des clones apramycine sensibles permet de sélectionner les plasmides de pSET153 et pSET153-*adnAB*.

Les plasmides de complémentation pSET152-*ku(A,B,C)* et pSET152-*lig(C,D)* ont été construits par clonage. Le gène cible est amplifié sur l'ADN génomique de *S. ambofaciens* ATCC23877 ou celui des BAC. Ce fragment d'amplification est digéré par *NdeI* et *XbaI* et ligué dans le plasmide pSET152 digéré par *NdeI-XbaI*. Les amorces utilisées sont listées dans le tableau 8.

Le plasmide pIJ6902-LCN-*adnAB* a été construit par PCR-targeting (figure 52). Les amorces utilisées pIJ6902-*adnAB*-1/pIJ6902-*adnAB*-2 sont listées dans le tableau 8. Le produit de PCR sur la matrice pIJ6902-LCN et contenant le promoteur inductible pTipA, le locus *sopABC* codant pour un système de partition active, les gènes *aac(3)IV* et *tsr* conférant respectivement la résistance à l'apramycine et le thiostrepton, une origine de répllication à faible nombre de copies (*ori2*), et le gène *repE* a été introduit dans la souche DY330 portant le plasmide pSET153-*adnAB* par transformation. Une sélection des transformants résultant du remplacement des

séquences du plasmide pSET153-*adnAB* par celles du plasmide pIJ6902-LCN sur apramycine permet de sélectionner le plasmide avec le produit de PCR intégré, qui est ensuite extrait et introduit par transformation dans la souche d'*E. coli* DH5 α . Une sélection négative sur kanamycine permet de sélectionner le plasmide recombinant.

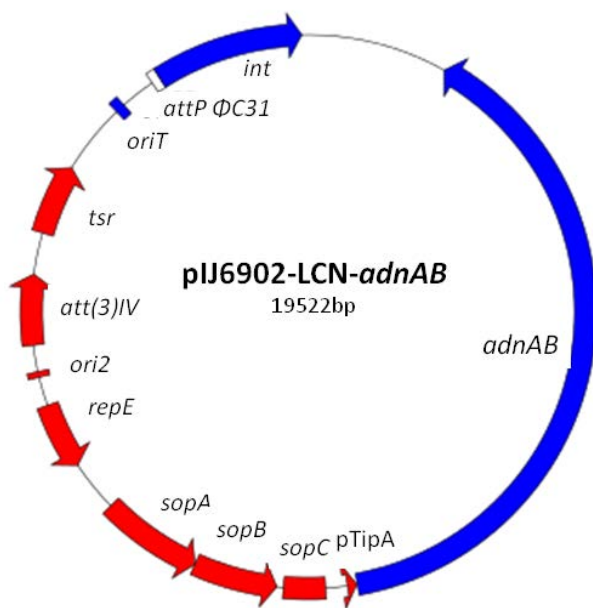


Figure 53 Carte de pIJ6902-LCN-*adnAB*

adnAB : locus *adnAB*. Ici, ce locus est placé sous contrôle du promoteur inducible (pTipA) ; *int* : gène codant une intégrase du phage Φ C31 ; *attP* Φ C31 : site d'attachement du phage Φ C31 ; *oriT* : origine de transfert de type RK2 ; *tsr* et *aac(3)IV* : gènes conférant respectivement la résistance au thiostrepton et l'apramycine ; *ori2* : origine de réplication du facteur F ; *repE* : gène codant une protéine de réplication ; *sopABC* : locus codant un système de partition. Les éléments en rouge proviennent du plasmide pIJ6902-LCN. Les éléments en bleu proviennent du pSET153-*adnAB*.

6.5.3. Les plasmides recombinants utilisés pour la localisation des homologues de Ku

Pour construire le plasmide *kuA-egfp*, le gène codant l'eGFP provenant du plasmide pIJ8660 (Sun *et al.*, 1999) et porté par un fragment *Xho*I est sous-cloné dans le vecteur pBlueScript SK+ puis intégré dans le plasmide pSMP88T via le site *Eco*RI (figure 48B) pour donner le plasmide pSMP88T-*egfp*. Ce plasmide a servi de matrice de PCR (long-range PCR, Taq, Takara) avec les amorces KuA-EGFP-F/KuA-EGFP-R. L'amorce F s'hybride dans sa partie 3' avec la séquence 5' de l'EGFP et son

extension 5' est homologue de la fin de la séquence codante de *kuA* à l'exclusion de son codon stop afin d'aboutir à une fusion traductionnelle. L'amorce R s'hybride en 3' avec le site *attR* et son extension 5' est homologue de la séquence en aval du codon stop du gène *kuA* (figure 54).

Le produit d'amplification de la cassette a été introduit par électroporation dans la souche d'*E. coli* BW25113-pKD20 contenant le BAC BAA16ZB5 (la résistance au chloramphénicol a été remplacée par celle conférant la résistance à la kanamycine). Des clones résistants à l'apramycine, donc contenant probablement les BAC recombinés avec le produit PCR ont ainsi pu être sélectionnés (*16B5KmΔCm-KuA:eGFP*). La construction a alors été vérifiée par séquençage.

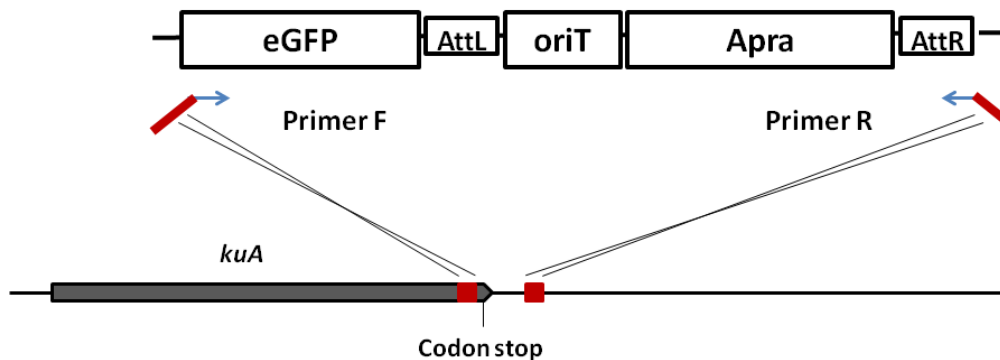


Figure 54 Construction du mutant *kuA-egfp*

Les parties 3' des amorces Primer F et Primer R s'hybrident avec le plasmide sont colorées en bleu, les parties 5', homologues des séquences de la fin du gène *kuA* sont colorées en rouge.

6.4. Extraction d'ADN et d'ARN

Les ADN plasmidiques (et de BAC) sont extraits des différentes souches d'*E. coli* par la méthode de lyse alcaline (Sambrook et Maniatis, 1989). Les ADN génomiques des souches sauvages et mutantes de *S. ambofaciens* ATCC23877 sont extraits par la méthode décrite par Kieser *et al.* (2000).

Les ARN des souches sauvages et mutantes de *S. ambofaciens* sont extraits à partir des cultures liquides par le kit « Aurum™ Total RNA Mini Kit » (Biorad) additionné d'une étape de sonication (4 cycles, 2 minutes, 15 secondes ON et 15 secondes OFF) permettant une meilleure efficacité de la lyse cellulaire. Les ARN extraits par le kit sont ensuite traités par DNase I (euromedex) pour assurer une élimination efficace de l'ADN génomique.

6.5. Transformation des souches d'*E. coli* et de *Streptomyces*

6.8.1. Transformation des souches d'*E. coli*

La préparation des cellules d'*E. coli* électrocompétantes est réalisée d'après le protocole proposé par Sambrook *et al.* (1989). Les électroporations sont effectuées à l'aide de l'appareil MicroPulser™ (Bio-rad). Pour la souche DY330, la culture subit un choc thermique à 42°C pendant 17 minutes pour activer le système de recombinaison de prophage λ avant la transformation de l'ADN linéaire (Yu *et al.*, 2000).

6.8.2. Conjugaison inter-générique

Les conjugaisons inter-génériques entre les souches d'*E. coli* ET-12567-pUZ8002 ou S17-1 porteuses des BAC ou plasmides, sauvages ou mutants, et les souches de *Streptomyces* sauvage et mutantes, ont été réalisées selon Kieser *et al.* (2000) : une

culture d'*E. coli* ET12567-pUZ8002 de 10 ml en milieu LB liquide additionné de chloramphénicol et de kanamycine, respectivement nécessaire à la sélection de la mutation *dam*⁻ et du plasmide pUZ8002 ou une culture d'*E. coli* S17-1 estensemencée au 1/100 à partir d'une culture en phase stationnaire. A une DO₆₀₀ ≈ 0,5, les cellules sont lavées à deux reprises par un volume de LB et reprises dans 500 µL de LB. Parallèlement, 5.10⁸ spores de *Streptomyces* sont diluées dans 500 µL de milieu 2YT. Les cellules d'*E. coli* sont mélangées aux spores et centrifugées brièvement afin de concentrer le mélange cellulaire dans un volume de 200 µL. Des dilutions en cascade sont ensuite effectuées dans 200 µl d'eau ultra-pure stérile jusqu'à 10⁻⁴ et sont étalées sur milieu SFM supplémenté en MgCl₂ (10 mM). Après une incubation de 16 à 20h à 30°C, une pression de sélection est appliquée par addition d'une solution d'antibiotique. La sélection des colonies de *Streptomyces* résistantes à différents antibiotiques peut être réalisée par repiquage ou par la méthode classique de réplique sur velours (Kieser *et al.*, 2000).

6.6. Tests de PCR quantitative et PCR semi-quantitative

La réaction de transcription inverse est réalisée avec 1 µg d'ARN de *Streptomyces* par le kit « iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit ». Pour le test de PCR quantitative, une amplification par PCR est réalisée avec 28 cycles de réaction. Le kit « iQ™ SYBR® Green Supermix » a été utilisé pour le test de PCR quantitative. Le gène *hrdB* sert de gène de référence pour la normalisation.

6.7. Tests d'activité nucléase

Les culots de cellules d'*E. coli* obtenus à partir d'une culture incubée pendant environ 15 h sont resuspendus dans un solution contenant 1 mM de DTT, 1 mM d'EDTA, 0,05 M de Tris pH 8 et 1 mg/ml de lysozyme et subit une sonication permettant la lyse cellulaire (3 cycles, 2 minutes, 15 secondes ON et 15 secondes

OFF) pour obtenir les extraits bruts. Le mélange de réaction contenant 50 mM de Tris-HCl (pH 8), 10 mM de MgCl₂, 50 μM d'ATP et 200 ng d'ADN linéaire (produit de PCR de 3,7 kb) et 1 μg des extraits bruts est incubé à 37°C pendant 0 h, 1.5 h et 3 h.

6.8. Caractérisation phénotypique

6.8.1. Test de viabilité cellulaire

Les cultures d'*E. coli* sontensemencées au 1/100 à partir d'une culture en phase stationnaire puis incubées à 37°C jusqu'à $DO_{600nm} \approx 0,3$. Différentes dilutions des cultures sont étalées sur du milieu LB par un ensemenceur spiral (easySpiral® d'Interscience) et incubées à 37°C pendant environ 20h avant le comptage des colonies. La viabilité des cellules est estimée par le nombre d'UFC dénombrées par millilitre de culture rapporté à la DO_{600nm} .

6.8.2. Exposition aux rayonnements UV

Les cultures d'*E. coli* sontensemencées au 1/100 à partir d'une culture en phase stationnaire puis incubées à 37°C jusqu'à $DO_{600nm} \approx 0,3$. Différentes dilutions des cellules dans le tampon phosphate (100mM pH7.0) sont étalées sur du milieu LB par l'ensemenceur spiral. Les boîtes de Pétri sont ensuite exposées à des rayonnements UV de 254 nm ($1 \text{ J.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) pendant différents temps correspondant à des doses de 0, 10 et 30 J/m². Les expériences ont été réalisées à l'abri de la lumière visible afin d'éviter l'induction du mécanisme de photoréactivation. Les boîtes sont ensuite incubées pendant environ 20h à 37°C toujours à l'abri de la lumière avant le comptage des colonies.

6.8.3. Traitement à la mitomycine C

Pour réaliser le traitement des spores de *S. ambofaciens* à la MMC, environ 10⁹ spores sont diluées dans 1 ml d'eau ultra-pure stérile contenant la mitomycine C en

concentration 0,1 µg/ml et incubées à 30°C pendant 3h sous agitation (250 rpm). Différentes dilutions sont ensuite étalées sur milieu SFM par l'ensemenceur spiral et incubées pendant 5 jours à 30°C avant le comptage des colonies.

6.8.4. Exposition aux rayonnements gamma

Des spores de *S. ambofaciens* sont exposées aux rayonnements gamma à dose 0, 1, 2,5, 4, 5 KGy. Les spores exposées sont ensuite étalées sur du milieu SFM et incubées pendant 5 jours à 30°C avant le comptage des colonies

6.8.5. Exposition au flux d'électrons

Les spores (environs 10^9) de *S. ambofaciens* diluées dans de l'eau stérile sont transférées dans une plaque de culture à 96 puits et exposées à un faisceau d'électrons d'une énergie de 1,8 MeV ayant administré des doses de 0, 0,09, 0,23, 0,46, 0,57, 0,89 et 1,9 KGy (Société AERIAL, Illkirch). Les spores exposées sont ensuite étalées sur milieu SFM et incubées pendant 5 jours à 30°C avant le comptage des colonies.

6.9. Observation au microscope à épifluorescence des souches de *Streptomyces*

Des lamelles sont enfoncées avec un angle d'environ 45° dans du milieu SFM additionné d'apramycine (50 µg/ml), supplémenté ou non avec du thiostrepton 20 µg/ml selon la souche étudiée. Les spores des souches d'intérêt sont ensemencées au cure-dent sur la face intérieure de la lamelle, au niveau de la zone d'insertion dans le milieu et ce sur toute la largeur de la lamelle. Après une incubation de 48h à 30°C, les lamelles sont délicatement retirées de la boîte de Pétri et montées avec une goutte d'eau sur une lame. Ces montages sont immédiatement observés au microscope optique à transmission en épi-fluorescence et en contraste

de phase avec l'objectif à immersion X100. L'incubation de 48h sur SFM permet d'observer à la fois mycélium végétatif, mycélium aérien, chainettes de spores et spores isolées.

Tableau 6. Liste des souches bactériennes et les plasmides utilisés dans ce travail

Souches et plasmides	Caractéristiques	Source ou référence
Streptomyces		
<i>S. ambofaciens</i> ATCC23877	Utilisée comme souche sauvage	(Pinnert-sindico, 1954)
<i>S. ambofaciens</i> DSM40697	Utilisée comme souche sauvage	
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	Utilisée comme souche sauvage	(Hopwood, 1999)
E.coli		
DH5α	<i>F</i> Φ <i>dlacZ</i> Δ <i>M15 endA1 supE44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169 λ⁻, hsdR17(r_K- m_K⁺), phoA relA1</i>	(Hanahan, 1983)
SURE	<i>e14- (mcrA) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 171 sbcC recB recJ umuC::Tn5 (kanR) uvrC supE44 lac gyr A96 relA1 thi-1 endA1 (F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (tetR))</i>	Stratagène
DY330	W3110 Δ <i>lacU169 gal490 lcl857 Δ(cro-bioA)</i>	(Yu <i>et al.</i> , 2000)
BW25113-pKD20	Utilisée pour la mutagenèse par PCR-targeting	(Datsenko et Wanner, 2000)
ET12567/pUZ8002	<i>dam-13::Tn9 dcm cat tet hsdM hsdR zjj-201::Tn10/tra neo RP4</i>	(MacNeil <i>et al.</i> , 1992; Paget <i>et al.</i> , 1999)
S17-1	<i>recA pro hsdR RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7</i>	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
JJC40	<i>leu6 his4 argE3 lacY1 galK2 ara14 xyl5 mtl1 tsx33 rpsL31 supE44 hsdR</i>	B. Michel (CNRS)
JJC315	Dérivée <i>recB268 :: Tn10/(Tet)</i> de JJC40	B. Michel (CNRS)
BACs and Plasmids		
BAB15ZE8	Ressource du locus <i>adnAB</i> pour la construction de pSET152- <i>adnAB</i>	
BAA16ZB5	Ressource pour la construction du mutant Δ <i>kuA</i> , <i>kuA-egfp</i> et le plasmide de complémentation pSET152- <i>kuA</i> .	
BAB6ZC3	Ressource pour la construction du mutant Δ <i>kuB</i> et le plasmide de complémentation pSET152- <i>kuB</i>	(Choulet <i>et al.</i> , 2006)
BAB27ZF1	Ressource pour la construction du mutant Δ <i>kuC</i> et le plasmide de complémentation pSET152- <i>kuC</i>	
BAB11ZA3	Ressource pour la construction du mutant Δ <i>ligC</i> et le plasmide de complémentation pSET152- <i>ligC</i>	
BAA4ZD4	Ressource pour la construction du mutant Δ <i>ligD</i>	
pNSV005	Plasmide de mutagenèse dérivé de pWED2	Dans ce travail
pSET152	Vecteur intergratif pour actinomycetes; <i>oriT</i> (RK2), <i>int</i> and <i>attP</i> (ΦC31), <i>aac(3)IV</i>	(Bierman <i>et al.</i> , 1992)
pSET153	Dérivé de pSET152 contenant <i>neo</i> au lieu de <i>aac(3)IV</i>	Dans ce travail
pSET152- <i>adnAB</i>	Dérivé de pSET152 contenant le locus <i>adnAB</i>	Dans ce travail
pSET153- <i>adnAB</i>	Dérivé de pSET152- <i>adnAB</i> contenant <i>neo</i> au lieu de <i>aac(3)IV</i>	Dans ce travail
pIJ6902-LCN	Dérivé de pIJ6902 à faible nombre de copies	Non publié

pIJ6902-LCN-*adnAB*Dérivé de pIJ6902-LCN contenant *adnAB*

Dans ce travail

pOSK1112

Utilisé pour l'excision de cassette de mutagèse

J-L, Pernodet (IGM, Orsay)

pSMP88T

Ressource de la cassette mutagenèse pour la construction
des mutants

(Chipot, 2007)

Tableau 7. Conditions de culture

LB		HT	
Tryptone	8 g	Extrait de viande	0,8 g
Extrait de levure	4 g	Extrait de levure	0,8 g
NaCl	4 g	Dextrine blanche	8 g
Agar (si solide)	16 g	NZ amine type A	1,6 g
Eau distillée	qsp 800 ml	CaCl ₂ , 7H ₂ O (20g/l)	0,8 ml
pH	7,2	Agar (si solide)	16 g
		Eau robinée	qsp 800 ml
		pH	7,3
SOC		2YT	
Bacto Tryptone	8 g	Extrait de viande	0,8 g
Extrait de levure	1 g	Extrait de levure	0,8 g
NaCl	0,1168 g	Dextrine blanche	8
KCl	0,03728 g	NZ amine type A	1,6 g
MgCl ₂	0,4066 g	CaCl ₂ , 7H ₂ O (20g/l)	0,8 ml
MgSO ₄	0,493 g	Eau distillée	qsp 800 ml
Glucose	0,7206 g	pH	7,3
Eau distillée	qsp 200 ml	Agar (si solide)	16 g

SFM	
Farine de soja	8 g
Mannitol	8 g
Agar	8 g
Eau distillée	qsp 400 ml

Tableau 8. Liste d'amorces

Nom	Séquence	Function
AdnA-RT1	TCTTCCTCGCCGAGTACCTCGACGT	PCR quantitative et PCR semi-quantitative
AdnA-RT2	TCCTGGTACTCGTTCGACGTACACCG	
AdnB-RT1bis	CGCACCCACGCCGAGGAGAT	
AdnB-RT2bis	CCTCGGGCAGGTGCAGCAGA	
hrdB F	CGCGGCATGCTCTTCCT	
hrdB R	AGGTGGCGTACGTGGAGAAC	
rec1	TCCTGTCCCAGCCGGACAA	
rec2	GTCGCACCGAGGCGTAGAA	
K7_pSPM88-1	GATAGTCACGCAGATAGACACGC	
K7_pSPM88-2	GGTGAGTGTCTAACTGCGTGACA	
V1_U-AdnABf	ATAAAGCTTGCTGGGTGAGCGCCTCTGG	Délétion du locus <i>adnAB</i>
V1_U-AdnABr	ATAGATATCGCGTCCAGACGAGGGGGATC	
V1_D-AdnABf	ATAGATATCAAGCCCGCACCGTTCGCTCC	
V1_D-AdnABr	ATAGCTAGCCTGCTCGGCGATCCAGTGGC	
KanDApr_f	CACCACCGACTATTTGCAACAGTGCCGTTGATCGTGTATGCCAGTTC CGCCATTCTC	Remplacement du gène de résistance
KanDApr_r	GAGCGTCAGCATATCATCAGCGAGCTGAAGAAAGACAATCCATGAGATC CCCGCGCTGGA	
pIJ6902-adnAB-1	TGGGGGTGCGACGGGTGTCCGGTGGAGGAAGAGGAGCTCATATGTCCGC TCCCTTCTCTG	Création des plasmides pSET152 et pSET153- <i>adnAB</i>
pIJ6902-adnAB-2	ATATCTCATTTGCCCGGACGAGCGTCTGCTCCGCCATTCGCGTGATTG CCAAGCACGTC	
KuA-EGFP-F	GGGCACCCCAAGAGGACGGCGCCCCGCAAGCGCAGCGCCATGGCCATG GTGAGCAAGGGCGAGG	Construction de <i>kuA-egfp</i>
KuA-EGFP-R	CGCTGTCGGCGCACGGGGGTGACGCCCCGGACGGAGGGCGGATATCTGC CTCTTCGTCCCGAAGC	
Exp_KuA_F	CGACAGGACATATGCTGCACGTGCGATCCATCTGGAA	Construction des plasmides de complémentation
Exp_KuA_R	CGCTCTAGAGAGGGCGTCAGGGCGTTCGCTTGGCGG	
Exp_KuB_F	AGCGGACGCATATGGCACGGGCGATCTGGACCGGCGT	
Exp_KuB_R	CGCTCTAGATCAGGCGGGCGTGTCTCCCGCGGC	
Exp_KuC_F	GGAGGTTCATATGCCCCGCACCATCTGGTCCGGCGC	
Exp_KuC_R	CGCTCTAGACTAGGCGCTCCTCCTCGGTTTCCGGG	
Exp_LigC_F	CGCTCTAGAAGCGGGGACCGGTGGCCGCTCCTAC	

REFERENCES

7. Références

Aguilera, A., Chávez, S., and Malagón, F. (2000). Mitotic recombination in yeast: elements controlling its incidence. *Yeast* 16, 731–754.

Ahel, I., Vujaklija, D., Mikoc, A., and Gamulin, V. (2002). Transcriptional analysis of the *recA* gene in *Streptomyces rimosus*: identification of the new type of promoter. *FEMS Microbiol. Lett.* 209, 133–137.

Aigle, B., Holl, A.C., Angulo, J.F., Leblond, P., and Decaris, B. (1997). Characterization of two *Streptomyces ambofaciens recA* mutants: identification of the RecA protein by immunoblotting. *FEMS Microbiol. Lett.* 149, 181–187.

Akey, D., Martins, A., Aniukwu, J., Glickman, M.S., Shuman, S., and Berger, J.M. (2006). Crystal Structure and Nonhomologous End-joining Function of the Ligase Component of Mycobacterium DNA Ligase D. *J. Biol. Chem.* 281, 13412–13423.

Amundsen, S.K., Taylor, A.F., Chaudhury, A.M., and Smith, G.R. (1986). *recD*: the gene for an essential third subunit of exonuclease V. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 5558–5562.

Amundsen, S.K., Fero, J., Hansen, L.M., Cromie, G.A., Solnick, J.V., Smith, G.R., and Salama, N.R. (2008). *Helicobacter pylori* AddAB helicase-nuclease and RecA promote recombination-related DNA repair and survival during stomach colonization. *Mol. Microbiol.* 69, 994–1007.

Anderson, D.G., and Kowalczykowski, S.C. (1997). The recombination hot spot *chi* is a regulatory element that switches the polarity of DNA degradation by the RecBCD enzyme. *Genes Dev.* 11, 571–581.

Aniukwu, J., Glickman, M.S., and Shuman, S. (2008). The pathways and outcomes of mycobacterial NHEJ depend on the structure of the broken DNA ends. *Genes Dev.* 22, 512–527.

Aravind, L., and Koonin, E.V. (2001). Prokaryotic Homologs of the Eukaryotic DNA-End-Binding Protein Ku, Novel Domains in the Ku Protein and Prediction of a Prokaryotic Double-Strand Break Repair System. *Genome Res.* 11, 1365–1374.

Aravind, L., Walker, D.R., and Koonin, E.V. (1999). Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Res.* 27, 1223–1242.

Aravind, L., Makarova, K.S., and Koonin, E.V. (2000). Holliday junction resolvases and related nucleases: identification of new families, phyletic distribution and evolutionary trajectories. *Nucleic Acids Res.* 28, 3417–3432.

- Arnold, D.A., and Kowalczykowski, S.C. (1998). RecBCD helicase/nuclease. eLS.
- Arnold, D.A., Handa, N., Kobayashi, I., and Kowalczykowski, S.C. (2000). A novel, 11 nucleotide variant of χ , χ^* : one of a class of sequences defining the Escherichia coli recombination hotspot χ . *J. Mol. Biol.* *300*, 469–479.
- Asai, T., Sommer, S., Bailone, A., and Kogoma, T. (1993). Homologous recombination-dependent initiation of DNA replication from DNA damage-inducible origins in Escherichia coli. *EMBO J.* *12*, 3287–3295.
- Asai, T., Bates, D.B., and Kogoma, T. (1994). DNA replication triggered by double-stranded breaks in E. coli: Dependence on homologous recombination functions. *Cell* *78*, 1051–1061.
- Avery, O.T., MacLeod, C.M., and McCarty, M. (1944). Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. *J. Exp. Med.* *79*, 137–158.
- Bao, K., and Cohen, S.N. (2001). Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in Streptomyces. *Genes Dev.* *15*, 1518–1527.
- Bao, K., and Cohen, S.N. (2003). Recruitment of terminal protein to the ends of Streptomyces linear plasmids and chromosomes by a novel telomere-binding protein essential for linear DNA replication. *Genes Dev.* *17*, 774–785.
- Baumann, P., and Cech, T.R. (2000). Protection of telomeres by the Ku protein in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* *11*, 3265–3275.
- Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., and Stark, J.M. (2008). Alternative-NHEJ Is a Mechanistically Distinct Pathway of Mammalian Chromosome Break Repair. *PLoS Genet* *4*, e1000110.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiot. (Tokyo)* *58*, 1–26.
- Bhatnagar, S.K., and Bessman, M.J. (1988). Studies on the mutator gene, mutT of Escherichia coli. Molecular cloning of the gene, purification of the gene product, and identification of a novel nucleoside triphosphatase. *J. Biol. Chem.* *263*, 8953–8957.
- Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E.T., Rao, R.N., and Schonher, B.E. (1992). Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from Escherichia coli to Streptomyces spp. *Gene* *116*, 43–49.

Birch, A., Häusler, A., Vögli, M., Krek, W., and Hütter, R. (1989). Extremely large chromosomal deletions are intimately involved in genetic instability and genomic rearrangements in *Streptomyces glaucescens*. *Mol. Gen. Genet.* *MGG 217*, 447–458.

Boulton, S.J., and Jackson, S.P. (1996). Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res.* *24*, 4639–4648.

Bowater, R., and Doherty, A.J. (2006). Making Ends Meet: Repairing Breaks in Bacterial DNA by Non-Homologous End-Joining. *PLoS Genet* *2*, e8.

Capaldo, F.N., Ramsey, G., and Barbour, S.D. (1974). Analysis of the Growth of Recombination-Deficient Strains of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* *118*, 242.

Chambers, S.R., Hunter, N., Louis, E.J., and Borts, R.H. (1996). The mismatch repair system reduces meiotic homeologous recombination and stimulates recombination-dependent chromosome loss. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 6110–6120.

Chayot, R., Montagne, B., Mazel, D., and Ricchetti, M. (2010). An end-joining repair mechanism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 2141–2146.

Chédin, F., and Kowalczykowski, S.C. (2002). A novel family of regulated helicases/nucleases from Gram-positive bacteria: insights into the initiation of DNA recombination. *Mol. Microbiol.* *43*, 823–834.

Chédin, F., Noirot, P., Biaudet, V., and Ehrlich, S.D. (1998). A five-nucleotide sequence protects DNA from exonucleolytic degradation by AddAB, the RecBCD analogue of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* *29*, 1369–1377.

Chédin, F., Ehrlich, S.D., and Kowalczykowski, S.C. (2000). The *Bacillus subtilis* AddAB helicase/nuclease is regulated by its cognate Chi sequence in vitro. *J. Mol. Biol.* *298*, 7–20.

Chen, C.W., Huang, C.-H., Lee, H.-H., Tsai, H.-H., and Kirby, R. (2002). Once the circle has been broken: dynamics and evolution of *Streptomyces* chromosomes. *Trends Genet.* *TIG 18*, 522–529.

Chen, L., Trujillo, K., Ramos, W., Sung, P., and Tomkinson, A.E. (2001). Promotion of Dnl4-catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes. *Mol. Cell* *8*, 1105–1115.

Chen, W., He, F., Zhang, X., Chen, Z., Wen, Y., and Li, J. (2010). Chromosomal instability in *Streptomyces avermitilis*: major deletion in the central region and stable circularized chromosome. *BMC Microbiol.* *10*, 198.

Cheo, D.L., Bayles, K.W., and Yasbin, R.E. (1991). Cloning and characterization of DNA damage-inducible promoter regions from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *173*, 1696–1703.

Choulet, F., Aigle, B., Gallois, A., Mangenot, S., Gerbaud, C., Truong, C., Francou, F.-X., Fourier, C., Guérineau, M., Decaris, B., et al. (2006). Evolution of the Terminal Regions of the *Streptomyces* Linear Chromosome. *Mol. Biol. Evol.* *23*, 2361–2369.

Clark, A.J., Sandler, S.J., Willis, D.K., Chu, C.C., Blonar, M.A., and Lovett, S.T. (1984). Genes of the RecE and RecF pathways of conjugational recombination in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *49*, 453–462.

Claverys, J.-P., and Håvarstein, L.S. (2007). Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être. *Nat. Rev. Microbiol.* *5*, 219–229.

Clerici, M., Mantiero, D., Lucchini, G., and Longhese, M.P. (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* Sae2 protein promotes resection and bridging of double strand break ends. *J. Biol. Chem.* *280*, 38631–38638.

Cole, F., Keeney, S., and Jasin, M. (2010). Evolutionary conservation of meiotic DSB proteins: more than just Spo11. *Genes Dev.* *24*, 1201–1207.

Couëdel, C., Mills, K.D., Barchi, M., Shen, L., Olshen, A., Johnson, R.D., Nussenzweig, A., Essers, J., Kanaar, R., Li, G.C., et al. (2004). Collaboration of homologous recombination and nonhomologous end-joining factors for the survival and integrity of mice and cells. *Genes Dev.* *18*, 1293–1304.

Cox, J.M., Tsodikov, O.V., and Cox, M.M. (2005). Organized unidirectional waves of ATP hydrolysis within a RecA filament. *PLoS Biol.* *3*, e52.

Cromie, G.A. (2009). Phylogenetic Ubiquity and Shuffling of the Bacterial RecBCD and AddAB Recombination Complexes. *J. Bacteriol.* *191*, 5076–5084.

Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 6640–6645.

DeFazio, L.G., Stansel, R.M., Griffith, J.D., and Chu, G. (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J.* *21*, 3192–3200.

Degnen, G.E., and Cox, E.C. (1974). Conditional Mutator Gene in *Escherichia coli*: Isolation, Mapping, and Effector Studies. *J. Bacteriol.* *117*, 477.

Della, M., Palmboos, P.L., Tseng, H.-M., Tonkin, L.M., Daley, J.M., Topper, L.M., Pitcher, R.S., Tomkinson, A.E., Wilson, T.E., and Doherty, A.J. (2004). Mycobacterial Ku and

ligase proteins constitute a two-component NHEJ repair machine. *Science* 306, 683–685.

Denver, D.R., Feinberg, S., Steding, C., Durbin, M., and Lynch, M. (2006). The Relative Roles of Three DNA Repair Pathways in Preventing *Caenorhabditis elegans* Mutation Accumulation. *Genetics* 174, 57–65.

Đermić, D., Halupecki, E., Zahradka, D., and Petranović, M. (2005). RecBCD enzyme overproduction impairs DNA repair and homologous recombination in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 156, 304–311.

Dillingham, M.S., and Kowalczykowski, S.C. (2008). RecBCD Enzyme and the Repair of Double-Stranded DNA Breaks. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 72, 642–671.

Dixon, D.A., and Kowalczykowski, S.C. (1991). Homologous pairing in vitro stimulated by the recombination hotspot, Chi. *Cell* 66, 361–371.

Dixon, D.A., and Kowalczykowski, S.C. (1993). The recombination hotspot chi is a regulatory sequence that acts by attenuating the nuclease activity of the *E. coli* RecBCD enzyme. *Cell* 73, 87–96.

Doherty, A.J., and Jackson, S.P. (2001). DNA repair: how Ku makes ends meet. *Curr. Biol. CB* 11, R920–R924.

Doherty, A.J., Jackson, S.P., and Weller, G.R. (2001). Identification of bacterial homologues of the Ku DNA repair proteins. *FEBS Lett.* 500, 186–188.

Doroghazi, J.R., and Buckley, D.H. (2010). Widespread homologous recombination within and between *Streptomyces* species. *ISME J.* 4, 1136–1143.

Downs, J.A., and Jackson, S.P. (2004). A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 367–378.

Dronkert, M.L., Beverloo, H.B., Johnson, R.D., Hoeijmakers, J.H., Jasin, M., and Kanaar, R. (2000). Mouse RAD54 affects DNA double-strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3147–3156.

Dudley, D.D., Chaudhuri, J., Bassing, C.H., and Alt, F.W. (2005). Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv. Immunol.* 86, 43–112.

Ehrlich, S.D., Bierne, H., d' Alençon, E., Vilette, D., Petranovic, M., Noirot, P., and Michel, B. (1993). Mechanisms of illegitimate recombination. *Gene* 135, 161–166.

Emmerson, P.T. (1968). Recombination Deficient Mutants of *ESCHERICHIA COLI* K12 That Map between *thyA* and *argA*. *Genetics* 60, 19.

Finch, P.W., Storey, A., Chapman, K.E., Brown, K., Hickson, I.D., and Emmerson, P.T. (1986). Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *recB* gene. *Nucleic Acids Res.* 14, 8573.

Fischer, G., Decaris, B., and Leblond, P. (1997). Occurrence of deletions, associated with genetic instability in *Streptomyces ambofaciens*, is independent of the linearity of the chromosomal DNA. *J. Bacteriol.* 179, 4553–4558.

Flett, F., and Cullum, J. (1987). DNA deletions in spontaneous chloramphenicol-sensitive mutants of *Streptomyces coelicolor* A 3(2) and *Streptomyces lividans* 66. *Mol. Gen. Genet. MGG* 207, 499–502.

Flores, M.J., Ehrlich, S.D., and Michel, B. (2002). Primosome assembly requirement for replication restart in the *Escherichia coli* *holdG10* replication mutant. *Mol. Microbiol.* 44, 783–792.

Fukushima, T., Takata, M., Morrison, C., Araki, R., Fujimori, A., Abe, M., Tatsumi, K., Jasin, M., Dhar, P.K., Sonoda, E., et al. (2001). Genetic analysis of the DNA-dependent protein kinase reveals an inhibitory role of Ku in late S-G2 phase DNA double-strand break repair. *J. Biol. Chem.* 276, 44413–44418.

Galhardo, R.S., Do, R., Yamada, M., Friedberg, E.C., Hastings, P.J., Nohmi, T., and Rosenberg, S.M. (2009). *DinB* Upregulation Is the Sole Role of the SOS Response in Stress-Induced Mutagenesis in *Escherichia coli*. *Genetics* 182, 55–68.

Gamulin, V., Cetkovic, H., and Ahel, I. (2004). Identification of a promoter motif regulating the major DNA damage response mechanism of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 238, 57–63.

Garzón, A., Beuzón, C.R., Mahan, M.J., and Casadesús, J. (1996). *recB recJ* mutants of *Salmonella typhimurium* are deficient in transductional recombination, DNA repair and plasmid maintenance. *Mol. Gen. Genet. MGG* 250, 570–580.

Van Gent, D.C., Mizuuchi, K., and Gellert, M. (1996). Similarities between initiation of V(D)J recombination and retroviral integration. *Science* 271, 1592–1594.

Goldenfeld, N., and Woese, C. (2007). Biology's next revolution. *Nature* 445, 369–369.

Gong, C., Martins, A., Bongiorno, P., Glickman, M., and Shuman, S. (2004). Biochemical and Genetic Analysis of the Four DNA Ligases of *Mycobacteria*. *J. Biol. Chem.* 279, 20594–20606.

Gong, C., Bongiorno, P., Martins, A., Stephanou, N.C., Zhu, H., Shuman, S., and Glickman, M.S. (2005). Mechanism of nonhomologous end-joining in mycobacteria: a low-fidelity repair system driven by Ku, ligase D and ligase C. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 304–312.

Goodman, M.F. (2002). Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* *71*, 17–50.

Gorbalenya, A.E., and Koonin, E.V. (1993). Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *3*, 419–429.

Gravius, B., Bezmalinović, T., Hranueli, D., and Cullum, J. (1993). Genetic instability and strain degeneration in *Streptomyces rimosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* *59*, 2220.

Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *Epidemiol. Infect.* *27*, 113–159.

Grill, S., Gualerzi, C.O., Londei, P., and Blasi, U. (2000). Selective stimulation of translation of leaderless mRNA by initiation factor 2: evolutionary implications for translation. *EMBO J.* *19*, 4101–4110.

Grill, S., Moll, I., Hasenöhrl, D., Gualerzi, C.O., and Bläsi, U. (2001). Modulation of ribosomal recruitment to 5'-terminal start codons by translation initiation factors IF2 and IF3. *FEBS Lett.* *495*, 167–171.

Grompone, G., Seigneur, M., Ehrlich, S.D., and Michel, B. (2002). Replication fork reversal in DNA polymerase III mutants of *Escherichia coli*: a role for the β clamp. *Mol. Microbiol.* *44*, 1331–1339.

Gupta, R., Barkan, D., Redelman-Sidi, G., Shuman, S., and Glickman, M.S. (2011). Mycobacteria exploit three genetically distinct DNA double-strand break repair pathways. *Mol. Microbiol.* *79*, 316–330.

Hall, B.G. (1995). Genetics of selection-induced mutations: I. *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, and *uvrD* are selection-induced specific mutator loci. *J. Mol. Evol.* *40*, 86–93.

Halpern, D., Gruss, A., Claverys, J.-P., and Karoui, M.E. (2004). *rexAB* mutants in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* *150*, 2409–2414.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* *166*, 557–580.

- Harold, R.J., and Hopwood, D.A. (1970). Ultraviolet-sensitive mutants of *Streptomyces coelicolor* I. Phenotypic characterisation. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* *10*, 427–438.
- Hendrickson, H., and Lawrence, J.G. (2006). Selection for Chromosome Architecture in Bacteria. *J. Mol. Evol.* *62*, 615–629.
- Hickson, I.D., Atkinson, K.E., Hutton, L., Tomkinson, A.E., and Emmerson, P.T. (1984). Molecular amplification and purification of the *E. coli* recC gene product. *Nucleic Acids Res.* *12*, 3807.
- Hickson, I.D., Robson, C.N., Atkinson, K.E., Hutton, L., and Emmerson, P.T. (1985). Reconstitution of RecBC DNase activity from purified *Escherichia coli* RecB and RecC proteins. *J. Biol. Chem.* *260*, 1224–1229.
- Hiller, N.L., Ahmed, A., Powell, E., Martin, D.P., Eutsey, R., Earl, J., Janto, B., Boissy, R.J., Hogg, J., Barbadora, K., et al. (2010). Generation of Genic Diversity among *Streptococcus pneumoniae* Strains via Horizontal Gene Transfer during a Chronic Polyclonal Pediatric Infection. *PLoS Pathog* *6*, e1001108.
- Hopwood, D.A. (1999). Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico. *Microbiology* *145*, 2183–2202.
- Huang, T.-W., and Chen, C.W. (2006). A recA Null Mutation May Be Generated in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* *188*, 6771–6779.
- Huertas, P., Cortés-Ledesma, F., Sartori, A.A., Aguilera, A., and Jackson, S.P. (2008). CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature* *455*, 689–692.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., and Omura, S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotech* *21*, 526–531.
- Inoue, S., Higashiyama, K., Uchida, T., Hiratsu, K., and Kinashi, H. (2003). Chromosomal circularization in *Streptomyces griseus* by nonhomologous recombination of deletion ends. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *67*, 1101–1108.
- Ip, S.C.Y., Rass, U., Blanco, M.G., Flynn, H.R., Skehel, J.M., and West, S.C. (2008). Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature* *456*, 357–361.

Ivanov, E.L., Sugawara, N., Fishman-Lobell, J., and Haber, J.E. (1996). Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 142, 693–704.

Iyer, L.M., Babu, M.M., and Aravind, L. (2006). The HIRAN domain and recruitment of chromatin remodeling and repair activities to damaged DNA. *Cell Cycle Georget. Tex* 5, 775–782.

Jaco, I., Munoz, P., Goytisolo, F., Wesoly, J., Bailey, S., Taccioli, G., and Blasco, M.A. (2003). Role of Mammalian Rad54 in Telomere Length Maintenance. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5572–5580.

Janzen, C.J., Lander, F., Dreesen, O., and Cross, G.A.M. (2004). Telomere length regulation and transcriptional silencing in KU80-deficient *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* 32, 6575–6584.

Jones, P.G., VanBogelen, R.A., and Neidhardt, F.C. (1987). Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169, 2092.

Karanjawala, Z.E., Adachi, N., Irvine, R.A., Oh, E.K., Shibata, D., Schwarz, K., Hsieh, C.-L., and Lieber, M.R. (2002). The embryonic lethality in DNA ligase IV-deficient mice is rescued by deletion of Ku: implications for unifying the heterogeneous phenotypes of NHEJ mutants. *DNA Repair* 1, 1017–1026.

Karoui, M.E., Ehrlich, D., and Gruss, A. (1998). Identification of the lactococcal exonuclease/recombinase and its modulation by the putative Chi sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 626–631.

Karu, A.E., Sakaki, Y., Echols, H., and Linn, S. (1975). The gamma protein specified by bacteriophage gamma. Structure and inhibitory activity for the recBC enzyme of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 250, 7377–7387.

Keeney, S. (2001). Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 52, 1–53.

Khidhir, M.A., Casaregola, S., and Holland, I.B. (1985). Mechanism of transient inhibition of DNA synthesis in ultraviolet-irradiated *E. coli*: inhibition is independent of recA whilst recovery requires RecA protein itself and an additional, inducible SOS function. *Mol. Gen. Genet. MGG* 199, 133–140.

Kickstein, E., Harms, K., and Wackernagel, W. (2007). Deletions of recBCD or recD influence genetic transformation differently and are lethal together with a recJ deletion in *Acinetobacter baylyi*. *Microbiology* 153, 2259–2270.

Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, K.F., Chater, K.F., and Hopwood, D.A. (2000). *Practical streptomyces genetics* (Norwich, England: The John Innes Foundation).

Kogoma, T. (1997). Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 61, 212–238.

Konrad, E.B., Modrich, P., and Lehman, I.R. (1973). Genetic and enzymatic characterization of a conditional lethal mutant of *Escherichia coli* K12 with a temperature-sensitive DNA ligase. *J. Mol. Biol.* 77, 519–529.

Kooistra, J., Haijema, B.J., and Venema, G. (1993). The *Bacillus subtilis* addAB genes are fully functional in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 7, 915–923.

Koonin, E.V., Wolf, Y.I., Kondrashov, A.S., and Aravind, L. (2000). Bacterial homologs of the small subunit of eukaryotic DNA primase. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2, 509–512.

Kowalczykowski, S.C. (2000). Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem. Sci.* 25, 156–165.

Kowalczykowski, S.C., Dixon, D.A., Eggleston, A.K., Lauder, S.D., and Rehrauer, W.M. (1994). Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 58, 401–465.

Kretschmar, A., Otto, C., Holz, M., Werner, S., Hübner, L., and Barth, G. (2013). Increased homologous integration frequency in *Yarrowia lipolytica* strains defective in non-homologous end-joining. *Curr. Genet.* 59, 63–72.

Kurthkoti, K., Kumar, P., Jain, R., and Varshney, U. (2008). Important role of the nucleotide excision repair pathway in *Mycobacterium smegmatis* in conferring protection against commonly encountered DNA-damaging agents. *Microbiology* 154, 2776–2785.

Kushwaha, A.K., and Grove, A. (2013). *Mycobacterium smegmatis* Ku binds DNA without free ends. *Biochem. J.* 456, 275–282.

Kuzminov, A. (1999). Recombinational Repair of DNA Damage in *Escherichia coli* and Bacteriophage ϕ . *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 751–813.

Kuzminov, A. (2001). DNA replication meets genetic exchange: Chromosomal damage and its repair by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 8461–8468.

Leblond, P., Demuyter, P., Moutier, L., Laakel, M., Decaris, B., and Simonet, J.M. (1989). Hypervariability, a new phenomenon of genetic instability, related to DNA amplification in *Streptomyces ambofaciens*. *J. Bacteriol.* *171*, 419–423.

Leblond, P., Demuyter, P., Simonet, J.M., and Decaris, B. (1991). Genetic instability and associated genome plasticity in *Streptomyces ambofaciens*: pulsed-field gel electrophoresis evidence for large DNA alterations in a limited genomic region. *J. Bacteriol.* *173*, 4229–4233.

LeCuyer, B.E., Criss, A.K., and Seifert, H.S. (2010). Genetic Characterization of the Nucleotide Excision Repair System of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* *192*, 665–673.

Lederberg, J., and Lederberg, E.M. (1952). REPLICA PLATING AND INDIRECT SELECTION OF BACTERIAL MUTANTS. *J. Bacteriol.* *63*, 399.

Lee, S.E., Moore, J.K., Holmes, A., Umezu, K., Kolodner, R.D., and Haber, J.E. (1998). *Saccharomyces* Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell* *94*, 399–409.

Lin, Y.S., Kieser, H.M., Hopwood, D.A., and Chen, C.W. (1993). The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol. Microbiol.* *10*, 923–933.

Lindahl, T., and Nyberg, B. (1972). Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry (Mosc.)* *11*, 3610–3618.

Lloyd, R.G., and Sharples, G.J. (1993a). Processing of recombination intermediates by the RecG and RuvAB proteins of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* *21*, 1719–1725.

Lloyd, R.G., and Sharples, G.J. (1993b). Dissociation of synthetic Holliday junctions by *E. coli* RecG protein. *EMBO J.* *12*, 17–22.

Lloyd, R.G., Evans, N.P., and Buckman, C. (1987). Formation of recombinant lacZ+ DNA in conjugational crosses with a recB mutant of *Escherichia coli* K12 depends on recF, recJ, and recO. *Mol. Gen. Genet. MGG* *209*, 135–141.

Lovett, S.T., and Clark, A.J. (1984). Genetic analysis of the recJ gene of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* *157*, 190–196.

Luria, S.E., and Delbrück, M. (1943). Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics* *28*, 491–511.

MacNeil, D.J., Gewain, K.M., Ruby, C.L., Dezeny, G., Gibbons, P.H., and MacNeil, T. (1992). Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* 111, 61–68.

Malinin, A.I., Vostrov, A.A., Rybchin, V.N., and Svarchevskiĭ, A.N. (1992). [Structure of ends of linear plasmid N15]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 19–22.

Malyarchuk, S., Wright, D., Castore, R., Klepper, E., Weiss, B., Doherty, A.J., and Harrison, L. (2007). Expression of *Mycobacterium tuberculosis* Ku and Ligase D in *Escherichia coli* results in RecA and RecB-independent DNA end-joining at regions of microhomology. *DNA Repair* 6, 1413–1424.

Maringele, L., and Lydall, D. (2002). EXO1-dependent single-stranded DNA at telomeres activates subsets of DNA damage and spindle checkpoint pathways in budding yeast yku70Delta mutants. *Genes Dev.* 16, 1919–1933.

Martin, P., Dary, A., and Decaris, B. (1998). Generation of a genetic polymorphism in clonal populations of the bacterium *Streptomyces ambofaciens*: characterization of different mutator states. *Mutat. Res.* 421, 73–82.

Martin, P., Dary, A., André, A., Fischer, G., Leblond, P., and Decaris, B. (1999). Intracolonial polymorphism in the bacterium *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877: evidence for a high degree of heterogeneity of the wild type clones. *Mutat. Res.* 430, 75–85.

Masterson, C., Boehmer, P.E., McDonald, F., Chaudhuri, S., Hickson, I.D., and Emmerson, P.T. (1992). Reconstitution of the activities of the RecBCD holoenzyme of *Escherichia coli* from the purified subunits. *J. Biol. Chem.* 267, 13564–13572.

Mazin, A.V., Mazina, O.M., Bugreev, D.V., and Rossi, M.J. (2010). Rad54, the motor of homologous recombination. *DNA Repair* 9, 286–302.

McKenzie, G.J., Lee, P.L., Lombardo, M.-J., Hastings, P.J., and Rosenberg, S.M. (2001). SOS Mutator DNA Polymerase IV Functions in Adaptive Mutation and Not Adaptive Amplification. *Mol. Cell* 7, 571–579.

Mertens, K., Lantsheer, L., Ennis, D.G., and Samuel, J.E. (2008). Constitutive SOS expression and damage-inducible AddAB-mediated recombinational repair systems for *Coxiella burnetii* as potential adaptations for survival within macrophages. *Mol. Microbiol.* 69, 1411–1426.

Meselson, M., and Stahl, F.W. (1958). The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 44, 671.

Michaels, M.L., Cruz, C., and Miller, J.H. (1990). *mutA* and *mutC*: two mutator loci in *Escherichia coli* that stimulate transversions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *87*, 9211–9215.

Michel, B., Ehrlich, S.D., and Uzzell, M. (1997). DNA double-strand breaks caused by replication arrest. *EMBO J* *16*, 430–438.

Michel, B., Flores, M.-J., Viguera, E., Grompone, G., Seigneur, M., and Bidnenko, V. (2001). Rescue of arrested replication forks by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 8181–8188.

Michel, B., Grompone, G., Florès, M.-J., and Bidnenko, V. (2004). Multiple pathways process stalled replication forks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 12783–12788.

Modrich, P. (1991). Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu. Rev. Genet.* *25*, 229–253.

Movahedzadeh, F., Colston, M.J., and Davis, E.O. (1997). Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* LexA: recognition of a Cheo (Bacillus-type SOS) box. *Microbiol. Read. Engl.* *143 (Pt 3)*, 929–936.

Newcombe, H.B. (1949). Origin of Bacterial Variants. *Nature* *164*, 150–151.

Neylon, C., Kralicek, A.V., Hill, T.M., and Dixon, N.E. (2005). Replication termination in *Escherichia coli*: structure and antihelicase activity of the Tus-Ter complex. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *MMBR* *69*, 501–526.

Nimonkar, A.V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J.L., Wyman, C., Modrich, P., and Kowalczykowski, S.C. (2011). BLM–DNA2–RPA–MRN and EXO1–BLM–RPA–MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev.* *25*, 350–362.

Niu, H., Raynard, S., and Sung, P. (2009). Multiplicity of DNA end resection machineries in chromosome break repair. *Genes Dev.* *23*, 1481–1486.

Ogawa, T., Ueda, Y., Yoshimura, K., and Shigeoka, S. (2005). Comprehensive analysis of cytosolic Nudix hydrolases in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* *280*, 25277–25283.

Oliver, D.B., and Goldberg, E.B. (1977). Protection of parental T4 DNA from a restriction exonuclease by the product of gene 2. *J. Mol. Biol.* *116*, 877–881.

Orii, K.E., Lee, Y., Kondo, N., and McKinnon, P.J. (2006). Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 10017–10022.

Osipovich, O., Durum, S.K., and Muegge, K. (1997). Defining the minimal domain of Ku80 for interaction with Ku70. *J. Biol. Chem.* *272*, 27259–27265.

Paget, M.S.B., Chamberlin, L., Atrih, A., Foster, S.J., and Buttner, M.J. (1999). Evidence that the Extracytoplasmic Function Sigma Factor σ^E Is Required for Normal Cell Wall Structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* *181*, 204–211.

Pfeiffer, P., Goedecke, W., and Obe, G. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* *15*, 289–302.

Pinnert-sindico, S. (1954). Une nouvelle espèce de *Streptomyces* productrice d'antibiotiques: *Streptomyces ambofaciens* n. sp. caractères cultureux. *Ann. Inst. Pasteur* *87*, 702–707.

Pitcher, R.S., Tonkin, L.M., Green, A.J., and Doherty, A.J. (2005a). Domain Structure of a NHEJ DNA Repair Ligase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mol. Biol.* *351*, 531–544.

Pitcher, R.S., Wilson, T.E., and Doherty, A.J. (2005b). New insights into NHEJ repair processes in prokaryotes. *Cell Cycle Georget. Tex* *4*, 675–678.

Pitcher, R.S., Brissett, N.C., and Doherty, A.J. (2007a). Nonhomologous end-joining in bacteria: a microbial perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* *61*, 259–282.

Pitcher, R.S., Green, A.J., Brzostek, A., Korycka-Machala, M., Dziadek, J., and Doherty, A.J. (2007b). NHEJ protects mycobacteria in stationary phase against the harmful effects of desiccation. *DNA Repair* *6*, 1271–1276.

Quiberoni, A., Rezaïki, L., Karoui, M.E., Biswas, I., Tailliez, P., and Gruss, A. (2001). Distinctive features of homologous recombination in an “old” microorganism, *Lactococcus lactis*. *Res. Microbiol.* *152*, 131–139.

Radman, M. (1975). SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Sci.* *5A*, 355–367.

Rand, L., Hinds, J., Springer, B., Sander, P., Buxton, R.S., and Davis, E.O. (2003). The majority of inducible DNA repair genes in *Mycobacterium tuberculosis* are induced independently of RecA. *Mol. Microbiol.* *50*, 1031–1042.

Raynal, A., Karray, F., Tuphile, K., Darbon-Rongère, E., and Pernodet, J.-L. (2006). Excisable cassettes: new tools for functional analysis of *Streptomyces* genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* *72*, 4839–4844.

Rayssiguier, C., Thaler, D.S., and Radman, M. (1989). The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature* *342*, 396–401.

Reagan, M.S., Pittenger, C., Siede, W., and Friedberg, E.C. (1995). Characterization of a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* with a deletion of the RAD27 gene, a structural homolog of the RAD2 nucleotide excision repair gene. *J. Bacteriol.* *177*, 364–371.

Redenbach, M., Flett, F., Piendl, W., Glocker, I., Rauland, U., Wafzig, O., Kliem, R., Leblond, P., and Cullum, J. (1993). The *Streptomyces lividans* 66 chromosome contains a 1 MB deletogenic region flanked by two amplifiable regions. *Mol. Gen. Genet.* *MGG 241*, 255–262.

Ricchetti, M., Dujon, B., and Fairhead, C. (2003). Distance from the Chromosome End Determines the Efficiency of Double Strand Break Repair in Subtelomeres of Haploid Yeast. *J. Mol. Biol.* *328*, 847–862.

Riha, K., and Shippen, D.E. (2003). Ku is required for telomeric C-rich strand maintenance but not for end-to-end chromosome fusions in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 611–615.

Riha, K., Heacock, M.L., and Shippen, D.E. (2006). The role of the nonhomologous end-joining DNA double-strand break repair pathway in telomere biology. *Annu. Rev. Genet.* *40*, 237–277.

Rocha, E.P.C., Cornet, E., and Michel, B. (2005). Comparative and Evolutionary Analysis of the Bacterial Homologous Recombination Systems. *PLoS Genet* *1*, e15.

Sanchez, H., Kidane, D., Reed, P., Curtis, F.A., Cozar, M.C., Graumann, P.L., Sharples, G.J., and Alonso, J.C. (2005). The RuvAB branch migration translocase and RecU Holliday junction resolvase are required for double-stranded DNA break repair in *Bacillus subtilis*. *Genetics* *171*, 873–883.

Sanchez, H., Kidane, D., Castillo Cozar, M., Graumann, P.L., and Alonso, J.C. (2006). Recruitment of *Bacillus subtilis* RecN to DNA double-strand breaks in the absence of DNA end processing. *J. Bacteriol.* *188*, 353–360.

Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* *450*, 509–514.

Sasaki, M., Fujiyoshi, T., Shimada, K., and Takagi, Y. (1982). Fine structure of the *recB* and *recC* gene region of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *109*, 414–422.

Seigneur, M., Bidnenko, V., Ehrlich, S.D., and Michel, B. (1998). RuvAB Acts at Arrested Replication Forks. *Cell* *95*, 419–430.

Sekiguchi, M., Nakabeppu, Y., Sakumi, K., and Tuzuki, T. (1996). DNA-repair methyltransferase as a molecular device for preventing mutation and cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *122*, 199–206.

Selva, E.M., New, L., Crouse, G.F., and Lahue, R.S. (1995). Mismatch correction acts as a barrier to homeologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *139*, 1175–1188.

Shuman, S., and Glickman, M.S. (2007). Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nat. Rev. Microbiol.* *5*, 852–861.

Siede, W., Friedl, A.A., Dianova, I., Eckardt-Schupp, F., and Friedberg, E.C. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* Ku Autoantigen Homologue Affects Radiosensitivity Only in the Absence of Homologous Recombination. *Genetics* *142*, 91–102.

Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983). A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nat. Biotechnol.* *1*, 784–791.

Sinha, K.M., Unciuleac, M.-C., Glickman, M.S., and Shuman, S. (2009). AdnAB: a new DSB-resecting motor–nuclease from mycobacteria. *Genes Dev.* *23*, 1423–1437.

Smeulders, M.J., Keer, J., Speight, R.A., and Williams, H.D. (1999). Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to Stationary Phase. *J. Bacteriol.* *181*, 270–283.

Štambuk, S., and Radman, M. (1998). Mechanism and Control of Interspecies Recombination in *Escherichia coli*. I. Mismatch Repair, Methylation, Recombination and Replication Functions. *Genetics* *150*, 533–542.

Stark, J.M., Pierce, A.J., Oh, J., Pastink, A., and Jasin, M. (2004). Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 9305–9316.

Stephanou, N.C., Gao, F., Bongiorno, P., Ehrt, S., Schnappinger, D., Shuman, S., and Glickman, M.S. (2007). Mycobacterial Nonhomologous End Joining Mediates Mutagenic Repair of Chromosomal Double-Strand DNA Breaks. *J. Bacteriol.* *189*, 5237–5246.

Sun, H., Treco, D., Schultes, N.P., and Szostak, J.W. (1989). Double-strand breaks at an initiation site for meiotic gene conversion. *Nature* 338, 87–90.

Tanner, N.K., Cordin, O., Banroques, J., Doère, M., and Linder, P. (2003). The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol. Cell* 11, 127–138.

Thibessard, A., and Leblond, P. (2014). Subtelomere Plasticity in the Bacterium *Streptomyces*. In *Subtelomeres*, E.J. Louis, and M.M. Becker, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 243–258.

Tominaga, Y., Tsuzuki, T., Shiraishi, A., Kawate, H., and Sekiguchi, M. (1997). Alkylation-induced apoptosis of embryonic stem cells in which the gene for DNA-repair, methyltransferase, had been disrupted by gene targeting. *Carcinogenesis* 18, 889–896.

Tutt, A. (2001). Mutation in *Brca2* stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. *EMBO J.* 20, 4704–4716.

Unciuleac, M.-C., and Shuman, S. (2010). Double Strand Break Unwinding and Resection by the Mycobacterial Helicase-Nuclease AdnAB in the Presence of Single Strand DNA-binding Protein (SSB). *J Biol Chem* 285, 34319–34329.

Vierling, S., Weber, T., Wohlleben, W., and Muth, G. (2000). Transcriptional and Mutational Analyses of the *Streptomyces lividans* *recX* Gene and Its Interference with *RecA* Activity. *J. Bacteriol.* 182, 4005–4011.

Vierling, S., Weber, T., Wohlleben, W., and Muth, G. (2001). Evidence that an additional mutation is required to tolerate insertional inactivation of the *Streptomyces lividans* *recA* gene. *J. Bacteriol.* 183, 4374–4381.

Vilenchik, M.M., and Knudson, A.G. (2003). Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 12871–12876.

Vogel, H., Lim, D.-S., Karsenty, G., Finegold, M., and Hasty, P. (1999). Deletion of *Ku86* causes early onset of senescence in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 10770–10775.

Volff, J.N., and Altenbuchner, J. (1997). Influence of disruption of the *recA* gene on genetic instability and genome rearrangement in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 179, 2440–2445.

- Walker, J.R., Corpina, R.A., and Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412, 607–614.
- Wang, J., Chen, R., and Julin, D.A. (2000). A Single Nuclease Active Site of the Escherichia coli RecBCD Enzyme Catalyzes Single-stranded DNA Degradation in Both Directions. *J. Biol. Chem.* 275, 507–513.
- Wang, S.T., Setlow, B., Conlon, E.M., Lyon, J.L., Imamura, D., Sato, T., Setlow, P., Losick, R., and Eichenberger, P. (2006). The Forespore Line of Gene Expression in Bacillus subtilis. *J. Mol. Biol.* 358, 16–37.
- Wang, Y., Ghosh, G., and Hendrickson, E.A. (2009). Ku86 represses lethal telomere deletion events in human somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12430–12435.
- Washburn, B.K., and Kushner, S.R. (1991). Construction and analysis of deletions in the structural gene (uvrD) for DNA helicase II of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 173, 2569–2575.
- Weller, G.R., and Doherty, A.J. (2001). A family of DNA repair ligases in bacteria? *FEBS Lett.* 505, 340–342.
- Weller, G.R., Kysela, B., Roy, R., Tonkin, L.M., Scanlan, E., Della, M., Devine, S.K., Day, J.P., Wilkinson, A., d'Adda di Fagagna, F., et al. (2002). Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science* 297, 1686–1689.
- Wenner, T., Roth, V., Fischer, G., Fourrier, C., Aigle, B., Decaris, B., and Leblond, P. (2003). End-to-end fusion of linear deleted chromosomes initiates a cycle of genome instability in Streptomyces ambofaciens. *Mol. Microbiol.* 50, 411–425.
- West, S.C. (2003). Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 435–445.
- Wilson, J.H., Berget, P.B., and Pipas, J.M. (1982). Somatic cells efficiently join unrelated DNA segments end-to-end. *Mol. Cell. Biol.* 2, 1258–1269.
- Wilson, T.E., Grawunder, U., and Lieber, M.R. (1997). Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining. *Nature* 388, 495–498.
- De Wind, N., Dekker, M., Berns, A., Radman, M., and te Riele, H. (1995). Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. *Cell* 82, 321–330.

Winocour, E., and Keshet, I. (1980). Indiscriminate recombination in simian virus 40-infected monkey cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 4861–4865.

Wohlleben, W., Hartmann, V., Hillemann, D., Krey, K., Muth, G., Nussbaumer, B., and Pelzer, S. (1994). Transfer and establishment of DNA in *Streptomyces* (a brief review). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* *41*, 381–389.

Wollman, E.-L., Jacob, F., and Hayes, W. (1956). Conjugation and Genetic Recombination in *Escherichia coli* K-12. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *21*, 141–162.

Wyman, C., Ristic, D., and Kanaar, R. (2004). Homologous recombination-mediated double-strand break repair. *DNA Repair* *3*, 827–833.

Xu, Y.J., Zhen, Y.S., and Goldberg, I.H. (1994). C1027 chromophore, a potent new enediyne antitumor antibiotic, induces sequence-specific double-strand DNA cleavage. *Biochemistry (Mosc.)* *33*, 5947–5954.

Yoshimura, K., Ogawa, T., Ueda, Y., and Shigeoka, S. (2007). AtNUDX1, an 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate pyrophosphohydrolase, is responsible for eliminating oxidized nucleotides in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* *48*, 1438–1449.

Yu, D., Ellis, H.M., Lee, E.-C., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Court, D.L. (2000). An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 5978–5983.

Yu, M., Souaya, J., and Julin, D.A. (1998). Identification of the nuclease active site in the multifunctional RecBCD enzyme by creation of a chimeric enzyme. *J. Mol. Biol.* *283*, 797–808.

Yun, M.H., and Hiom, K. (2009). CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature* *459*, 460–463.

Zawilak-Pawlik, A., Kois, A., Majka, J., Jakimowicz, D., Smulczyk-Krawczynszyn, A., Messer, W., and Zakrzewska-Czerwińska, J. (2005). Architecture of bacterial replication initiation complexes: orisomes from four unrelated bacteria. *Biochem. J.* *389*, 471–481.

Zha, S., Boboila, C., and Alt, F.W. (2009). Mre11: roles in DNA repair beyond homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 798–800.

Zhang, X., Chen, W., Zhang, Y., Jiang, L., Chen, Z., Wen, Y., and Li, J. (2012). Deletion of ku homologs increases gene targeting frequency in *Streptomyces avermitilis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*

Zhang, Y., Hefferin, M.L., Chen, L., Shim, E.Y., Tseng, H.-M., Kwon, Y., Sung, P., Lee, S.E., and Tomkinson, A.E. (2007). Role of Dnl4-Lif1 in nonhomologous end-joining repair complex assembly and suppression of homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 639–646.

Zheng, X., Hu, G.-Q., She, Z.-S., and Zhu, H. (2011). Leaderless genes in bacteria: clue to the evolution of translation initiation mechanisms in prokaryotes. *BMC Genomics* *12*, 361.

Zhu, H., and Shuman, S. (2005a). A Primer-dependent Polymerase Function of *Pseudomonas aeruginosa* ATP-dependent DNA Ligase (LigD). *J. Biol. Chem.* *280*, 418–427.

Zhu, H., and Shuman, S. (2005b). Novel 3' -Ribonuclease and 3' -Phosphatase Activities of the Bacterial Non-homologous End-joining Protein, DNA Ligase D. *J. Biol. Chem.* *280*, 25973–25981.

Zhu, H., and Shuman, S. (2006). Substrate Specificity and Structure-Function Analysis of the 3' -Phosphoesterase Component of the Bacterial NHEJ Protein, DNA Ligase D. *J. Biol. Chem.* *281*, 13873–13881.

Zhu, H., and Shuman, S. (2007). Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* DNA ligases C and D. *Nucleic Acids Res.* *35*, 3631–3645.

Zhu, H., Wang, L.K., and Shuman, S. (2005). Essential Constituents of the 3' -Phosphoesterase Domain of Bacterial DNA Ligase D, a Nonhomologous End-joining Enzyme. *J. Biol. Chem.* *280*, 33707–33715.

Zhu, Z., Chung, W.-H., Shim, E.Y., Lee, S.E., and Ira, G. (2008). Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* *134*, 981–994.

Zuñiga-Castillo, J., Romero, D., and Martínez-Salazar, J.M. (2004). The Recombination Genes addAB Are Not Restricted to Gram-Positive Bacteria: Genetic Analysis of the Recombination Initiation Enzymes RecF and AddAB in *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* *186*, 7905–7913.