

UNIVERSITE D'EVRY-VAL D'ESSONNE

*Ecole Doctorale
Des Génomes Aux Organismes*

THESE de DOCTORAT

Spécialité : Biochimie-Biologie Moléculaire & Microbiologie

Présentée par

Mohea COUTURIER

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE d'EVRY-VAL D'ESSONNE

**Les ADN topoisomérases
du crenarchaeon hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus* :
Régulateurs du métabolisme de l'ADN ?**

Soutenance : 7 Novembre 2013 à Orsay

Membres du Jury :

Dr. Emmanuelle DELAGOUTTE
Dr. Christiane ELIE
Dr. Claire BOUTHIER de la TOUR
Dr. Purificacion LOPEZ-GARCIA
Pr. Abdelghani SGHIR
Pr. Marc NADAL
Dr. Florence GARNIER

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Co-directrice de thèse

Remerciements

En premier lieu, je voudrais remercier l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté sans hésitation et avec enthousiasme d'évaluer mon travail.

Ensuite, je remercie Marc et Florence. Marc, merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur cette thématique et d'avoir accepté que je prenne certaines responsabilités. Florence, merci de m'avoir donné ma chance en fin de licence et d'avoir ainsi fait débiter cette histoire de trois ans. Merci d'avoir partagé ton savoir sur ce superbe petit être qu'est *Sulfolobus solfataricus* P2. Je vous renouvelle mes remerciements pour m'avoir consacré de votre temps que je sais précieux et partagé entre plusieurs sites. Merci aussi pour votre confiance aussi bien dans la réalisation du projet de thèse que lors des différents événements scientifiques auxquels j'ai participé. Merci pour cette autonomie acquise et qui me permettra, je l'espère, d'avancer. Sur un registre tout aussi scientifique, je vous remercie de m'avoir encouragé lors de mon monitorat exécuté à l'Université de Versailles Saint-Quentin.

Je rebondis tout de suite sur *Versailles* pour te remercier Delphine de m'avoir donné l'envie de poursuivre dans la biologie. Je remercie également la fine équipe Marie-Pierre, Marie, Delphine, Stéphane et Christophe pour votre gentillesse. Hélène, je te remercie de m'avoir fait participer aux travaux pratiques de Bi 530. Merci aussi d'avoir partagé avec moi ta bonne humeur et ton dynamisme !

Je lance un *big up* à toutes ces personnes de l'IGM qui ont accepté que je fasse partie de leur vie et m'ont supportée durant ces années passées sur Orsay !

Patrick, je te remercie pour nos échanges lors des réunions de labos et ce superbe congrès en Italie ! Je ne peux pas parler du laboratoire sans faire un gros *bip bip ! Ouais !* à Danièle ainsi qu'à Jacques. Danièle, je te remercie pour ton écoute, ton partage des prunes ainsi que pour m'avoir permis d'ouvrir mon étude à la Topo VI. Jacques, mon cher co-pilote de congrès ! Merci pour ton humour qui fut important tout au long de ces années. Le rire, mieux qu'un steak ! Tamarra, malgré ce que tu penses cher pilier, tes encouragements m'ont énormément apporté et tu as grandement participé à mon parcours ! Ludo... Un thésard bordélique, à l'arrache mais un poto qui déchire !!! Je te remercie pour ton aide, ton écoute, tes conseils, nos discussions très intellectuelles sur *Les Anges*, à tous nos *Allo ! Nan mais allo !* mais surtout, merci de m'avoir soutenue !!! Estelle, nous avons partagé quelques recettes de cuisine extrêmophiles, des éclats de rire et tes expériences d'après-thèse vont me permettre d'appréhender au mieux cette nouvelle période. Dorian, merci d'avoir si bien encaissé les p'tites bagarres entre collègues ainsi que nos joutes verbales toujours placées sur le ton de l'humour ! Merci Virginia pour ta bonne humeur. Mariiiiiiiiizzzzze ! Je te remercie pour tes talons qui ont rythmé mes journées et, plus sérieusement, un grand merci pour ton soutien ! Merci Aurore pour ton extrême gentillesse et tous tes conseils. Evelyne, je te remercie pour ta grande générosité et ta spontanéité que

je n'oublierais pas. Mon petit juckbox Mymy ! Merci pour ses petites chansons quotidiennes qui m'ont toujours mises de bonne humeur.

Flo, je te remercie pour toutes nos discussions, tous nos délires, ton soutien sans failles, enfin, merci pour TOUT. Martine, ma Martoche, merci d'avoir partagé avec moi ta graaaaande expérience de la vie ! Je te remercie aussi de m'avoir écouté, disputé et encouragé. Claire, ton soutien, tes petits rendez-vous « café » et nos « pump it up ! » furent, sont, très importants pour moi. Les girls, sachez que vous m'avez boosté et pour ça, merci !

Merci beaucoup Christiane d'avoir toujours été disponible pour m'écouter et surtout je te remercie pour ton extrême gentillesse. Tuteur de ouf, merci ! Adrienne, je voudrais te remercier pour ton aide, ton soutien et surtout ton amitié. Julie, je te remercie pour ta bonne humeur et d'avoir tenté de contrecarrer ma poisse légendaire avec tes fiches vaudou ! Adrienne et Julie, merci d'avoir partagé la pièce *Sulfolobus* et d'avoir supporté au quotidien la petite boule de nerf que je suis...

Je voudrais aussi prendre quelques lignes pour remercier les gangsters de la cafète ! Christophe je te remercie pour nos francs fous rires (et il y en a eu beaucoup) mais aussi pour tes conseils et nos discussions. Chère Pascale, mille mercis pour ta bienveillance, tes conseils avisés et francs ainsi que d'avoir toujours répondu « présente » lorsque j'en ai eu besoin (que je m'en aperçoive ou non (et oui l'histoire du pain au chocolat !)). Merci Cécile pour nos repas et rigolades partagés ! Merci pour ton optimisme qui me manque parfois, bon ok souvent ☺ !

Merci à vous jolies rencontres des escaliers ! Cécile et Marie-Claude je vous remercie d'avoir pris de votre temps à l'occasion de vos pauses pour écouter quelques unes de mes histoires et partager également vos anecdotes ! Christine, je te remercie pour tes encouragements ! Armel, merci de m'avoir fais relativiser et voir certains points positivement. Super Célia, je te remercie pour ton dynamisme et pour ton rire très communicatif ! Chère Suzanne, je te remercie pour tes nombreux conseils ainsi que de m'avoir accueillie dans ton petit oasis lors de l'été 2013.

Simone et Barry je vous remercie pour votre investissement dans notre pratique de l'anglais. Barry, thank you so much for your help and your advises. Barry et Michael je vous remercie pour votre précieuse aide lors de mes recherches de post-doc.

Je te remercie beaucoup super Isabelle pour ton soutien, ton humour excellent et tes mots toujours réconfortants. Merci cher Olivier d'avoir respecté notre superbe caméra et pour m'avoir appris un tour informatique ! Informatique dites-vous? Merci Mazyar pour tes encouragements et ton écoute. Je voudrais aussi remercier chaleureusement une nana à plusieurs casquettes et qui assure un max! Merci d'avoir pris de votre temps à Cosmos et toi pour nos petites discussions matinales. Merci Anne-Laure pour tes conseils toujours avisés et ton soutien ! Merci Valérie et Brigitte pour votre aide lors de mes différentes commandes ou réclamations aux fournisseurs.

Je ne serais rien sans mes parents ni ma petite sœur. Merci de m'avoir écouté et conseillé sans même savoir de quoi je parlais, de m'avoir soutenue tout au long de cette histoire et surtout merci d'avoir trouvé les mots justes pour que j'avance et fasse de mon mieux. Si certains *ne savent pas comment on fait les papas*, et bien j'ai une bonne adresse ! Si je n'ai pas dépéri, et bien c'est grâce à toi maman ! Oui j'avoue ! C'est ma maman qui me faisait mes gamelles ! Merci et encore merci à vous deux ! Vous m'avez tellement apportée que c'est donc un peu votre doctorat à vous aussi. Itiax, je te remercie pour les présentations que tu as subies, merci pour ta présence au quotidien ainsi que pour avoir supporté mon moi ! Je remercie aussi Nonna et Carméla, un duo de choc, pour m'avoir toujours encouragée. Mario, merci d'avoir cru en moi. Loulou, mille mercis d'avoir soutenu mes projets et d'avoir toujours été à mes côtés.

Bon les potos c'est à votre tour ! Yannick, je te remercie de tout cœur pour ton amitié sans égal et ton extrême gentillesse. C'est qui le plus fort ? Merci d'avoir partagé mon, et ton, quotidien en temps réel ! Ju, *toi même tu sais meuf* ! Merci de m'avoir embarquée dans tes aventures et d'avoir écouté toutes mes histoires. Mèg Mèg super star ! Merci pour nos rigolades et surtout pour m'accepter comme je suis ! Merci à vous trois d'être le miroir qui me permet d'avancer et j'espère vous remercier encore longtemps !

Un spécial remerciement à mon collègue très *hot*, *Sulfo*, ainsi qu'à mon fidèle destrier Curly !!!

L.P, B.S, Z, I.P, K.P, P, SOAD, S et LMFAO merci d'avoir rythmé toutes mes journées !

ALLER, je laisse les mots musicaux de fin à Z

Je dédie cette thèse à mon cher P. M. I

Résumé

Les ADN topoisomérases sont des enzymes capables de moduler la torsion de la double hélice d'ADN afin de rendre compatible sa topologie avec les différents processus cellulaires impliquant l'ADN. Les hyperthermophiles possèdent au moins une topoisomérase particulière, la reverse gyrase qui est constituée à la fois d'un domaine topoisomérase IA et d'un domaine hélicase de type SF2.

Mon sujet de thèse a eu pour objectif de déterminer principalement l'implication des ADN topoisomérases IA dans les différents processus cellulaires de *Sulfolobus solfataricus*. Ce crenarchaeon hyperthermophile possède, en plus, d'une ADN topoisomérase de type II (Topo VI), trois ADN-topoisomérases IA dont une « classique » (TopA) et deux reverse gyrases (TopR1 et TopR2). Notre approche a permis d'estimer, pour la première fois, le nombre de TopR1 et de TopR2 par cellule en fonction des différentes conditions testées. L'étude des variations quantitatives des ADN topoisomérases a clairement mis en évidence que TopR1 et TopR2 sont régulées différemment ce qui renforce l'hypothèse d'une spécialisation de leurs fonctions. Nous avons ainsi montré que TopR1 est responsable du maintien de l'homéostasie du surenroulement de l'ADN. Si la Topo VI de par son activité antagoniste est impliquée dans ce même contrôle homéostatique, elle ne fait pas l'objet d'une régulation quantitative. De plus, nous avons mis en évidence que TopR1 était liée à la vie à haute température. Enfin, nos résultats suggèrent que TopR2 serait pour sa part impliquée dans la stabilité des génomes.

L'identification des partenaires protéiques respectifs des quatre ADN topoisomérases de *S. solfataricus* permettra d'avoir une vision globale des réseaux de régulation permettant de résoudre les différentes des contraintes topologiques générées au cours de la vie de cet hyperthermophile.

Abstract

DNA topoisomerases act in all DNA metabolism processes to control the DNA topology. Hyperthermophiles possess at least a particular topoisomerase, the reverse gyrase composed of a DNA topoisomerase IA domain and a helicase SF2 domain within the same polypeptide.

The general objective of my thesis was to determine the involvement of each DNA topoisomerase in different cellular processes of *S. solfataricus*. This hyperthermophilic crenarchaeon possesses in addition to a type II DNA topoisomerase (Topo VI), three DNA topoisomerases IA : a classical one (TopA) and two reverse gyrases (TopR1 and TopR2). Our experimental approach allowed to estimate for the first time the number of TopR1 and TopR2 per cell in relation to different conditions. The study of quantitative variations of each DNA topoisomerase clearly showed that TopR1 and TopR2 are differently regulated suggesting that they are involved in distinct cellular processes. Indeed, we showed that TopR1 is the main actor of the homeostatic control of the DNA supercoiling. If the Topo VI with its antagonistic activity is involved in this homeostatic control, there is no regulation at the level of protein quantity. In addition we evidenced that TopR1 is somehow linked to the life at high temperature. Our results suggest that TopR2 is involved in genome stability.

The identification of the respective potential partners of the four DNA topoisomerases of *S. solfataricus* will allow to get a more detailed understanding of the DNA topology regulation during the hyperthermophilic life style.

Préambule

Le monde vivant est divisé en trois domaines : les eucaryotes, les bactéries et les archées. Les représentants de ce troisième domaine du vivant restent encore méconnus du grand public et, lorsqu'ils sont connus, ils sont souvent associés à la notion de vie en conditions extrêmes.

De ce fait, le premier chapitre de l'introduction de cette thèse sera l'occasion d'expliquer en quoi les archées sont des micro-organismes extrémophiles tout en montrant, par le biais des processus informationnels, qu'ils partagent de nombreux traits avec les eucaryotes.

Cette thèse porte sur l'étude des implications des ADN topoisomérases du *crenarchaeon* hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus* P2. Les ADN topoisomérases sont des enzymes capables de moduler la torsion de la double hélice afin de rendre compatible la topologie de l'ADN avec les différents processus cellulaires impliquant l'ADN. Les organismes hyperthermophiles appartenant aux domaines des bactéries et des archées sont les seuls à posséder une ADN topoisomérase IA particulière, la reverse gyrase. De manière intéressante, ces organismes doivent encore plus veiller au maintien de l'intégrité de leur génome du fait des hautes températures qui augmentent la fréquence d'apparition des dommages dans l'ADN et déstabilisent la géométrie de la double hélice. Bien qu'il semble que la reverse gyrase intervienne dans la stabilité des génomes, ses fonctions précises restent encore méconnues.

Ainsi dans le deuxième chapitre de l'introduction, nous définirons ce qu'est la topologie de l'ADN puis nous identifierons les protéines qui affectent la géométrie de la double hélice. Ceci nous permettra de présenter, dans le troisième chapitre, les différentes familles d'ADN topoisomérases selon leurs caractéristiques *in vitro* et de préciser leurs implications connues dans les principaux processus cellulaires liés au métabolisme de l'ADN. Enfin, dans le quatrième et dernier chapitre de l'introduction, nous verrons les enjeux de la vie à haute température sur la molécule d'ADN ainsi que les réponses apportées par les hyperthermophiles pour palier à l'instabilité génomique. Nous ferons notamment l'état des connaissances sur l'implication de la reverse gyrase dans la vie à hautes températures.

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION | 1 |
| I - Archaea..... | 3 |
| A- La découverte du troisième domaine du vivant | 3 |
| B- Diversité écologique – Notion d’extrêmophiles | 7 |
| C- La valeur ajoutée des extrêmophiles | 11 |
| D- Les archées, des microbes qui nous ressemblent | 13 |
| 1/ Réplication et division cellulaire | 13 |
| 2/ Transcription | 17 |
| II- Topologie de l’ADN : un jeu d’enfant | 21 |
| A- Définitions | 21 |
| 1/ Molécule d’ADN | 21 |
| 2/ Les grandeurs topologiques | 23 |
| B- Etat du chromosome <i>in vivo</i> | 27 |
| C- Modulateurs de topologie | 31 |
| 1/ Protéines chromosomales : effet statique sur l’ADN | 31 |
| 2/ Protéines du métabolisme de l’ADN : effet dynamique sur l’ADN..... | 37 |
| III - Le monde magique des ADN topoisomérases..... | 41 |
| A- D’un point de vue mécanistique | 41 |
| 1/ Leur « truc » : la réaction de trans-estérification..... | 41 |
| 2/ Les différentes familles de “magiciennes” | 41 |
| B- D’un point de vue fonctionnel | 47 |
| 1/ Régulation homéostatique du surenroulement | 47 |
| 2/ La résolution des contraintes créées lors de la réplication | 49 |
| a - Relaxation des supertours positifs générés en aval de la fourche | 49 |
| b - Prise en charge des précaténanes/caténanes en amont de la fourche | 53 |
| c - Résolution des jonctions à quatre branches..... | 57 |
| 3/ Résolution des contraintes topologiques créées au cours de la transcription | 59 |
| a - Relaxation des supertours positifs et négatifs | 59 |
| b - Régulation de l’expression des gènes | 61 |
| IV - Thermophilie et Reverse gyrase..... | 65 |
| A- Instabilité génomique | 65 |
| 1/ Impact de la température sur la topologie de l’ADN | 65 |
| 2/ Sensibilité de l’ADN vis-à-vis des hautes températures | 67 |
| B- Maintien de l’information génétique à hautes températures | 73 |
| 1/ Stabilisation de l’ADN | 73 |
| 2/ Réparation de l’ADN..... | 77 |
| C- La reverse gyrase | 79 |
| 1/ Marqueur de la thermophilie | 79 |
| 2/ La reverse gyrase est-elle essentielle pour la vie à haute température ? | 81 |
| 3/ Présentation des différents rôles proposés pour la reverse gyrase | 83 |
| Présentation du travail | 91 |

| | |
|--|------------|
| RESULTATS | 99 |
| I- Etude des variations quantitatives des ADN topoisomérases IA de <i>S. solfataricus</i> suivant les phases de croissance à différentes températures | 103 |
| II- Les ADN topoisomérases dans la régulation homéostatique du surenroulement de l'ADN chez <i>S. solfataricus</i> | 131 |
| III- Un hyperthermophile à basse température | 191 |
| IV- Résultats complémentaires | 265 |
| Recherche des partenaires protéiques des deux reverse gyrases | 265 |
| TopA de <i>S. solfataricus</i> : cible de deux inhibiteurs potentiels | 271 |
| DISCUSSION ET PERSPECTIVES | 279 |
| I- Fonctions des ADN topoisomérases de <i>S. solfataricus</i> | 281 |
| Fonctions potentielles de TopA | 281 |
| Fonctions potentielles de l'ADN topoisomérase VI | 285 |
| Fonction de TopR1 : Implication dans la régulation homéostatique du surenroulement de l'ADN | 289 |
| Fonction de TopR2 : Implication dans la stabilité des génomes | 291 |
| II- Compréhension du rôle de la reverse gyrase chez les hyperthermophiles | 293 |
| BIBLIOGRAPHIE | 301 |

Liste des figures

INTRODUCTION

I- *Archaea*

- Figure 1** Les différentes visions du monde vivant avant les travaux de Woese de 1977.
- Figure 2** Concept de « Bacterium » tiré de (Stanier et Van Niel de 1962).
- Figure 3** Les trois domaines du vivant selon Woese et Fox.
- Figure 4** Exemples des biotopes extrêmes.
- Figure 5** Structures aux rayons X des sous-unités des ARN polymérase de chacun des trois domaines du vivant.

II- Topologie de l'ADN : un jeu d'enfant

- Figure 6** La molécule d'ADN-B.
- Figure 7** Représentation des molécules d'ADN-A, d'ADN-Z et d'ADN-B.
- Figure 8** L'exemple de la balançoire.
- Figure 9** Trois catégories de protéines chromosomales de l'ADN.
- Figure 10** Schématisation des contraintes topologiques formées lors de l'avancée de la machinerie de transcription.

III- Le monde magique des ADN topoisomérases

- Figure 11** La réaction de trans-estérification.
- Figure 12** Les substrats et les réactions catalysées par les ADN topoisomérases.
- Figure 13** Résumé des différentes propriétés des ADN topoisomérases.
- Figure 14** Comparaison des séquences en acides aminés de TopR1 et de TopR2 de *Sulfolobus solfataricus*.
- Figure 15** Illustration de la régulation du surenroulement de l'ADN chez *Escherichia coli*.

IV- Thermophilie et Reverse gyrase

- Figure 16** Présentation de trois composants de l'ADN pouvant subir des dommages augmentés par la température.
- Figure 17** Le pourcentage en G+C est-il élevé chez les organismes hyperthermophiles ?

RESULTATS

I - Etude des variations quantitatives des ADN topoisomérases IA de *S. solfataricus* en fonction des phases de croissance à différentes températures.

- Figure 18** Courbe représentative de la croissance de *Sulfolobus solfataricus* cultivé à 80°C.
- Figure 19** Variations quantitatives de TopR1 et de TopR2 en fonction de la phase de croissance de *S. solfataricus* cultivé à 80°C (extraits bruts).
- Figure 20** Variations quantitatives de TopR1 et de TopR2 en fonction de la phase de croissance de *S. solfataricus* cultivé à 80°C (fractions sub-cellulaires).
- Figure 21** Courbe représentative de la croissance de *Sulfolobus solfataricus* cultivé à 88°C.
- Figure 22** Variations quantitatives de TopR1 et de TopR2 en fonction de la phase de croissance de *S. solfataricus* cultivé à 88°C (extraits bruts).
- Figure 23** Courbe représentative de la croissance de *Sulfolobus solfataricus* cultivé à 72°C.
- Figure 24** Variations quantitatives de TopR1 et de TopR2 en fonction de la phase de croissance de *S. solfataricus* cultivé à 72°C (extraits bruts).
- Figure 25** Courbe représentative de la croissance de *Sulfolobus solfataricus* cultivé à 60°C.
- Figure 26** Variations quantitatives de TopR1 et de TopR2 en fonction de la phase de croissance de *S. solfataricus* cultivé à 60°C (extraits bruts).

III - Un hyperthermophile à basse température

- Figure 27** Incidence du transfert des cellules de *S. solfataricus* de 45°C à 80°C sur le taux de division à court terme après différents temps à 45°C.
- Figure 28** Variations quantitatives de TopR1 et de TopR2 suite à un transfert des cellules de *S. solfataricus* de 80°C à 45°C à court terme (extraits bruts).

IV – Résultats complémentaires

- Figure 29** Profils protéiques au cours des différentes étapes de l'immuno-précipitation après migration sur gel SDS-PAGE (10%) coloré au bleu de coomassie.
- Figure 30** Effet de différentes dilutions de TopA recombinante sur l'activité de relaxation.
- Figure 31** Effet des deux inhibiteurs potentiels BEZ 9456 (A) et MIK 643 (B) sur l'activité de relaxation de TopA.
- Figure 32** Effet de l'inhibiteur potentiel BEZ 9456 sur l'activité de relaxation de TopA et traitement des produits de réaction à la protéinase K.

INTRODUCTION

I- *Archaea*

II- Topologie de l'ADN : un jeu d'enfant

III- Le monde magique des ADN topoisomérases

IV- Thermophilie et Reverse gyrase

Présentation du travail

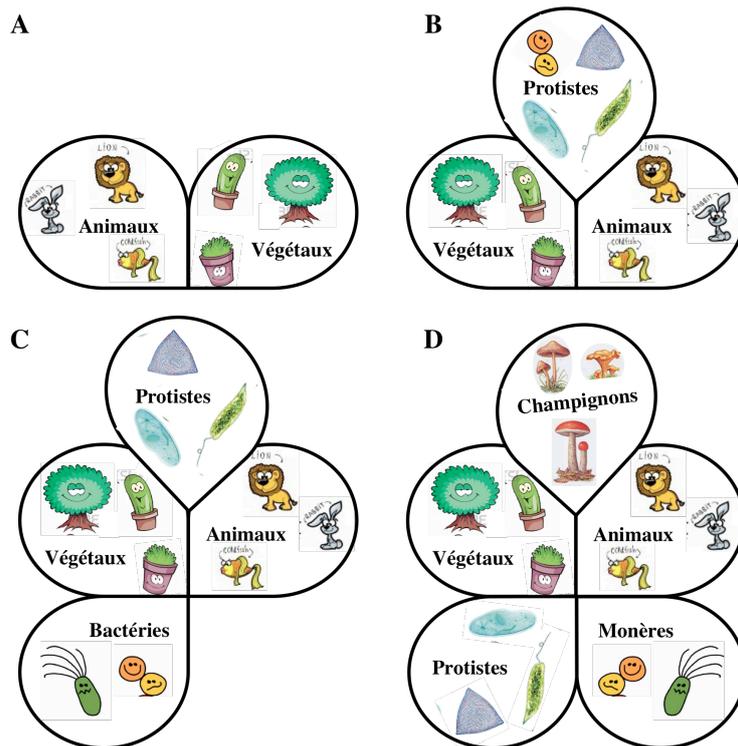


Figure 1- Les différentes visions du monde vivant avant les travaux de Woese de 1977.

A) Vision traditionnelle et ancienne du vivant centrée sur les macro-organismes. B) Le vivant selon la vision de Haeckel incluant les micro-organismes *via* le règne des protistes. C) Quatre règnes composent le vivant dont celui des bactéries qui forme un règne à part entière pour la première fois selon Copeland. D) Whittaker propose une représentation du monde à cinq règnes.

« ... the principle distinguishing features of the procaryotic cell are: **1** absence of internal membranes which separate the resting nucleus from the cytoplasm, and isolate the enzymatic machinery of photosynthesis and of respiration in specific organelles; **2** nuclear division by fission, not by mitosis, a character possibly related to the presence of a single structure which carries all the genetic information of the cell; and **3** the presence of a cell wall which contains a specific mucopeptide as its strengthening element. »

Stanier RY, Van Niel CB (1962) The concept of a bacterium. Arch Mikrobiol 42:17-35.

Figure 2- Concept de « Bacterium » tiré de (Stanier et Van Niel, 1962).

Extrait de la définition des procaryotes pour expliquer le concept de « Bacterium ». Cette description en trois points signalés en rouge est faite par comparaison aux caractéristiques des eucaryotes. Pour accentuer le côté négatif de la description, les traits présents chez les eucaryotes mais absents des procaryotes sont soulignés en rouge.

I - Archaea

A-La découverte du troisième domaine du vivant

Les micro-organismes sont largement distribués à travers le globe et font preuve d'une extraordinaire diversité. De plus, ils participent activement aux différents cycles géochimiques de la planète. Pourtant, ces « petits organismes » furent longtemps ignorés par la plupart des biologistes et sont encore méconnus du grand public.

Au 19^{ème} siècle, la vision traditionnelle du vivant était centrée sur les macro-organismes, avec le monde animal d'une part et le monde végétal d'autre part (Figure 1A). Louis Pasteur en 1864 réfuta l'idée de la génération spontanée en mettant en évidence l'implication de micro-organismes qu'il fut le premier à nommer « bactéries ». Haeckel, en 1866, intégra à la classification des organismes n'appartenant ni au règne animal, ni au règne végétal ce qui le conduisit à subdiviser le vivant en trois : les plantes, les animaux et les protistes (Figure 1B). Ces derniers sont constitués des bactéries, des myxomycètes ainsi que des protozoaires. Puis, dans les années 1930, les bactéries constituèrent à elles seules une quatrième subdivision du vivant selon la proposition de Copeland (Figure 1C). Outre le fait qu'un cinquième règne du vivant, les champignons, fut proposée sous la représentation du vivant de Whittaker, les bactéries n'y représentèrent plus un règne mais une subdivision du règne des monères (Figure 1D). Des critères phénotypiques, essentiellement morphologiques, furent employés afin de réaliser cette systématique. Au travers de l'exemple des bactéries, il semblait difficile à l'époque de classer de manière efficace les micro-organismes (Pace *et al.*, 2012) .

Des années 1920 aux années 1970, le monde vivant peut également être scindé en deux : les eucaryotes d'un côté et les procaryotes de l'autre. Cette dichotomie de base, énoncée par notre compatriote Edouard Chatton en 1938, est le résultat d'observations cytologiques. Les procaryotes (du grec « avant noyau ») par l'absence de caractéristiques qui définissent les eucaryotes (du grec « vrai noyau ») furent distingués de ces derniers. Stanier et Van Niel reprennent cette définition des procaryotes (Figure 2) pour la description du concept « bacterium » sans pour autant apporter une dimension évolutive (Stanier et van Niel 1962) . D'une part, les critères phénotypiques utilisés jusqu'alors empêchaient toute classification des micro-organismes et d'autre part le désir d'avoir une systématique plus compréhensible intégrant les liens évolutifs entre les espèces plaidèrent en faveur du remplacement des critères morphologiques par des critères moléculaires.

A

Table 1. Association coefficients (S_{AB}) between representative members of the three primary kingdoms

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|--|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 18S | — | 0.29 | 0.33 | 0.05 | 0.06 | 0.08 | 0.09 | 0.11 | 0.08 | 0.11 | 0.11 | 0.08 | 0.08 |
| 2. <i>Lemna minor</i> , 18S | 0.29 | — | 0.36 | 0.10 | 0.05 | 0.06 | 0.10 | 0.09 | 0.11 | 0.10 | 0.10 | 0.13 | 0.07 |
| 3. L cell, 18S | 0.33 | 0.36 | — | 0.06 | 0.06 | 0.07 | 0.07 | 0.09 | 0.06 | 0.10 | 0.10 | 0.09 | 0.07 |
| 4. <i>Escherichia coli</i> | 0.05 | 0.10 | 0.06 | — | 0.24 | 0.25 | 0.28 | 0.26 | 0.21 | 0.11 | 0.12 | 0.07 | 0.12 |
| 5. <i>Chlorobium vibrioforme</i> | 0.06 | 0.05 | 0.06 | 0.24 | — | 0.22 | 0.22 | 0.20 | 0.19 | 0.06 | 0.07 | 0.06 | 0.09 |
| 6. <i>Bacillus firmus</i> | 0.08 | 0.06 | 0.07 | 0.25 | 0.22 | — | 0.34 | 0.26 | 0.20 | 0.11 | 0.13 | 0.06 | 0.12 |
| 7. <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 0.09 | 0.10 | 0.07 | 0.28 | 0.22 | 0.34 | — | 0.23 | 0.21 | 0.12 | 0.12 | 0.09 | 0.10 |
| 8. <i>Aphanocapsa</i> 6714 | 0.11 | 0.09 | 0.09 | 0.26 | 0.20 | 0.26 | 0.23 | — | 0.31 | 0.11 | 0.11 | 0.10 | 0.10 |
| 9. Chloroplast (<i>Lemna</i>) | 0.08 | 0.11 | 0.06 | 0.21 | 0.19 | 0.20 | 0.21 | 0.31 | — | 0.14 | 0.12 | 0.10 | 0.12 |
| 10. <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> | 0.11 | 0.10 | 0.10 | 0.11 | 0.06 | 0.11 | 0.12 | 0.11 | 0.14 | — | 0.51 | 0.25 | 0.30 |
| 11. <i>M. ruminantium</i> strain M-1 | 0.11 | 0.10 | 0.10 | 0.12 | 0.07 | 0.13 | 0.12 | 0.11 | 0.12 | 0.51 | — | 0.25 | 0.24 |
| 12. <i>Methanobacterium</i> sp., Cariscoisolate JR-1 | 0.08 | 0.13 | 0.09 | 0.07 | 0.06 | 0.06 | 0.09 | 0.10 | 0.10 | 0.25 | 0.25 | — | 0.32 |
| 13. <i>Methanosarcina barkeri</i> | 0.08 | 0.07 | 0.07 | 0.12 | 0.09 | 0.12 | 0.10 | 0.10 | 0.12 | 0.30 | 0.24 | 0.32 | — |

Urkarya
Eubacteria
Archaeobacteria

B

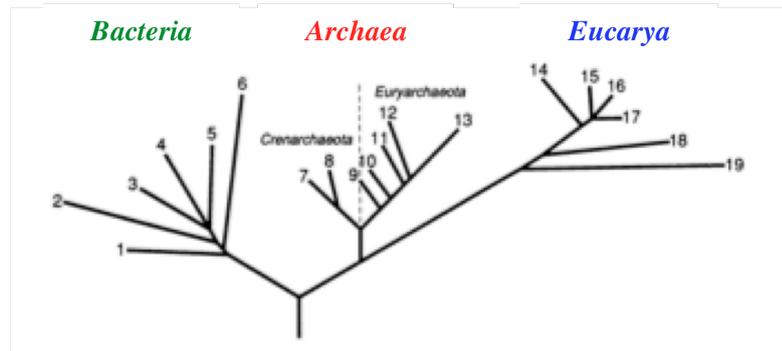


Figure 3- Les trois domaines du vivant selon Woese et Fox.

A) Matrice issue de l'article de 1977 donnant les coefficients d'association entre différentes espèces (Woese et Fox, 1977). Plus le coefficient d'association est élevé entre deux espèces, plus celles-ci sont proches. Cette matrice permet alors de distinguer les super règnes des **Urkarya** (en bleu), des **Eubacteria** (en vert) et des **Archaeobacteria** (en rouge). B) Adaptation de l'arbre phylogénétique issu de l'article de Woese et collaborateurs de 1990 (Woese *et al.*, 1990). Cet arbre a été obtenu en comparant les séquences d'ARNr 16S/18S de différents organismes représentés par les nombres de 1 à 19. Les trois domaines du vivant : **Bacteria** (de 1 à 6), **Archaea** (de 7 à 13) et **Eucarya** (de 14 à 19). Le domaine des archées est représenté par deux phyla majeurs : *Crenarchaeota* et *Euryarchaeota*.

Ainsi, Zuckerkandl et Pauling comprirent que les informations pouvant retracer l'histoire évolutive des organismes sont contenues au sein des séquences de macromolécules ou « semantides » telles que les polypeptides ou les acides nucléiques. D'ailleurs, à travers l'exemple des séquences protéiques qu'ils soupçonnent évoluées avec le temps, ils définirent les bases de la phylogénie moléculaire en comparant les séquences de protéines homologues dans le but d'établir des liens phylogénétiques (Zuckerkandl et Pauling 1965) . Pour sa part, Carl R. Woese s'intéressa tout d'abord au code génétique et à son origine universelle. Cela le conduisit naturellement à la phylogénie moléculaire et il développa très vite le concept d'horloge moléculaire. C'est dans ce cadre qu'il consacra son travail à l'analyse des séquences d'ARN ribosomiques (noté par la suite ARNr) car elles sont universelles, présentes en abondance, facilement isolables et accessibles à des techniques de « séquençage ». Carl R. Woese débuta donc ses travaux en hydrolysant les ARNr 5-5,8S contenus dans la grande sous-unité du ribosome par la RNase T1. Lorsque la technique de séquençage le permit, il opta pour les séquences d'ARNr 16S-18S qui permettaient une évaluation évolutive plus précise du fait de leur plus grande taille et donc de leur plus grande contenance en informations. Ponctuellement, pour comparer des espèces proches, il utilisa les ARNr 23-28S puisque ces séquences possèdent un nombre encore plus grand de positions informationnelles. L'analyse des ARNr révéla rapidement que son choix était particulièrement judicieux puisque ces ARNr se structurent en régions plus ou moins conservées. Ainsi, la comparaison de ces séquences issues de différents organismes vivants montre des positions identiques ou variables, reflétant des vitesses de substitutions, d'insertions ou encore de délétions faibles ou élevées. Ainsi, grâce à ces différences de vitesses, les séquences des ARNr représentent une bonne horloge moléculaire permettant de comparer l'ensemble du monde vivant. L'analyse des coefficients d'association (S_{AB}) d'ARNr 16S-18S révéla pour la première fois que les « bactéries méthanogènes », organismes connus pour leur métabolisme original de production de méthane, sont aussi distantes des bactéries dites classiques que des eucaryotes (Fox *et al.*, 1977) . C'est sur cette base que Carl R. Woese et George E. Fox ont alors proposé une nouvelle organisation phylogénétique du monde vivant (Woese et Fox, 1977) . Celui-ci doit être divisé en trois règnes primaires : *Eubacteria* (les bactéries), *Archaeobacteria* (les « bactéries méthanogènes ») et *Urkarya* (les cellules eucaryotes) (Figure 3A). Si cette étude révolutionna le monde de la microbiologie, c'est en partie parce que la phylogénie basée sur les ARNr 16S-18S permit de réfuter la dichotomie du monde vivant en procaryote et eucaryote en tant que classification et surtout invalida le fait que les procaryotes constituent un groupe monophylétique.

Néanmoins, le choix du terme « *Archaeobacteria* » laissait sous-entendre une relation directe avec leurs niches écologiques, des environnements supposés avoir existé il y a 3,5 à 4 milliards d'années mais également une ancienneté des représentants de ce règne par rapport à ceux du règne *Eubacteria*. Finalement, cette dénomination poussait à assimiler les archaebactéries aux ancêtres des bactéries classiques. Pour remédier à ce problème, Woese et ses collaborateurs proposèrent d'une part de modifier l'appellation « règne » en « domaine du vivant » et de renommer les trois règnes primaires *Eubacteria*, *Archaeobacteria* et *Urkarya* en *Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya* respectivement (Woese *et al.*, 1990). En 1990, le domaine des *Archaea* est alors composé des *Euryarchaeota*, comprenant entre autres les méthanogènes et les halophiles, et des *Crenarchaeota* regroupant les thermo-acidophiles soufre dépendants (Figure 3B) (Woese *et al.*, 1990).

Les concepts développés par Carl R. Woese ont contribué à l'essor de la microbiologie environnementale. En effet, la caractérisation des séquences du gène spécifiant l'ARNr 16S-18S isolées à partir de mélanges complexes d'organismes non cultivables retrouvés à travers une multitude d'environnements naturels ainsi que l'isolement de certains de ces organismes, ont étendu notre connaissance de la diversité phylogénique et des relations évolutives entre les micro-organismes et plus spécialement entre les membres du domaine des *Archaea* (Olsen *et al.*, 1986). D'ailleurs, c'est ce qui a permis d'identifier, entre autres, un autre *phylum* en plus des *Euryarchaeota* et des *Crenarchaeota* : les *Thaumarchaeota* (Brochier-Armanet *et al.*, 2008). Ces archées initialement décrites comme des *Crenarchaeota* mésophiles sont globalement distribuées en abondance à la fois dans des environnements marins et terrestres et plus récemment dans des environnements thermophiles (De la Torre *et al.*, 2008). Plusieurs autres *phyla* candidats ont aussi été proposés notamment les « Korarchaeota » (Barns *et al.*, 1996), les « Nanoarchaeota » (Huber *et al.*, 2002), les « Aigarchaeota » (Nunoura *et al.*, 2011) et les « Geoarchaeota » (Kozubal *et al.*, 2012) mais leurs statuts en tant que *phylum* demandent confirmation.

B- Diversité écologique – Notion d'extrêmophiles

La Terre possède un grand nombre de milieux environnementaux très divers alliant plusieurs paramètres physico-chimiques et dont certains sont extrêmes. Les sources chaudes, dont les exemples les plus connus sont celles du parc national de Yellowstone aux Etats-Unis

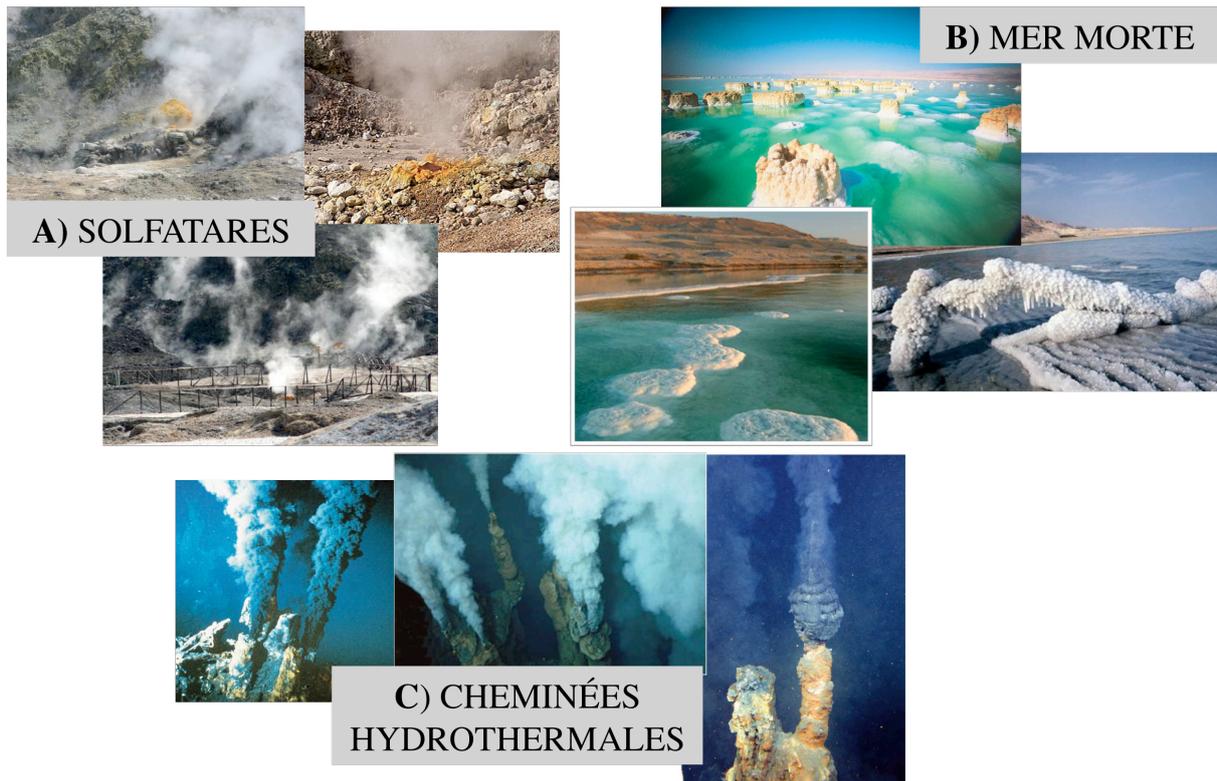


Figure 4- Exemples des biotopes extrêmes.

A) Les solfatares retrouvés en Italie, Russie, Islande ou encore Mexique sont des lieux où le pH y est acide et les températures élevées. **B)** La mer morte est un des biotopes où la concentration en sel est très élevée et le pH est alcalin. Les radiations UV sont très importantes du fait de la faible profondeur de la colonne d'eau. **C)** Les cheminées hydrothermales localisées au niveau des dorsales des fonds marins sont caractérisées par des températures très élevées mais aussi par des fortes pressions. Des micro-organismes aérobies peuvent se développer aussi bien dans les solfatares (**A**) que dans la mer morte (**B**) alors que les micro-organismes anaérobies sont isolés au niveau des cheminées hydrothermales (**C**) par exemple.

ainsi que les solfatares en Italie ou en Islande, combinent hautes températures et milieux très acides (Figure 4A). Aussi, les lacs fermés, comme c'est le cas de la mer Morte, en plus d'un fort ensoleillement, sont célèbres pour leurs fortes concentrations en sels (Figure 4B). Sous la surface des océans, il est possible de trouver des sources froides au niveau du plateau continental, ou des cheminées hydrothermales caractérisées par de très hautes chaleurs associées directement aux hautes pressions au niveau des dorsales océaniques (Figure 4C)! L'étude de la biodiversité de ces environnements extrêmes a permis de mettre en évidence la présence d'organismes appartenant aux trois domaines du vivant (*Bacteria*, *Archaea*, *Eucarya*). Cependant, la caractérisation de ces micro-organismes, qualifiés pour la première fois d'extrémophiles par R. D. MacElroy en 1974, montra que les archées sont des représentants majoritaires (Rothschild et Mancinelli, 2001 ; Cavicchioli *et al.*, 2011). De ce fait, les archées furent très vite associées aux environnements extrêmes, étiquette qui leur est essentiellement attribuée bien qu'une très grande proportion colonise des environnements mésophiles (Robertson *et al.*, 2005).

La signification du terme « extrême » est très subjective. En effet, pour nous, humains, les biotopes précédemment décrits nous sont inhospitaliers alors que pour les organismes qui les colonisent ces conditions sont indispensables à leur croissance. C'est donc de ce point de vue anthropocentriste que découle le qualificatif « extrémophile ». La découverte, par Thomas D. Brock, de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* au sein des sources chaudes de Yellowstone et dont la température de croissance en laboratoire est d'environ 70°C fut une surprise parce qu'elle posait non seulement la question de la vie à ces températures mais aussi celle de la vie dans ces biotopes extrêmes (Brock et Freeze, 1969). Cette surprise fut liée au fait qu'à l'époque de la découverte de *T. aquaticus*, il était inenvisageable du point de vue de la thermostabilité des macromolécules de trouver de la vie à des températures élevées. Pourtant, Thomas D. Brock par ses observations des sources chaudes suspecta puis montra la présence de vie à des températures plus élevées que 70°C repoussant alors cette température limite de la vie (Brock, 1997). Ainsi, si des organismes ont besoin de températures très hautes (thermophiles, 45°C-80°C et hyperthermophiles, supérieure à 80°C), d'autres ont besoin de températures plus basses (mésophiles, 20°C-45°C) voire très basses (psychrophiles, inférieure à 20°C). A Yellowstone, la température d'ébullition de l'eau est de 92,5°C mais au niveau des dorsales océaniques, la pression de la colonne d'eau, du fait de la profondeur, permet d'atteindre plus de 300°C ! Attention, aucun organisme ne peut vivre à 300°C du fait de la non thermostabilité des macromolécules à ces températures (White, 1984 ; Trent *et al.*, 1984). Néanmoins, des micro-organismes ont été collectés à certains endroits des cheminées

hydrothermales où les températures sont comprises entre 100°C et 150°C. Ainsi, les micro-organismes isolés au niveau de ces biotopes sont à la fois hyperthermophiles et piezophiles (ou barophiles), c'est-à-dire qu'ils ont à la fois besoin de hautes températures et de fortes pressions pour se développer. Par exemple, l'archée hyperthermophile *Pyrolobus fumarii*, connue pour croître en laboratoire à une température de 113°C, a une température optimale de croissance de 106°C sous une pression de 250 bars (Blöchl *et al.*, 1997). La température haute compatible avec la vie a été récemment revue à la hausse avec la découverte de la souche 121 : cette archée a un temps de génération de 24 heures à 121°C et reste viable après une exposition de 2 heures à une température égale à 130°C (Kashefi et Lovley, 2003) ! Il y a autant de catégories d'extrêmophiles que d'environnements que nous considérons, nous, comme extrêmes. De ce fait, en plus des hyperthermophiles, des psychrophiles et des piezophiles, les organismes anaérobies tels que les méthanogènes appartiennent aux extrêmophiles. En effet, ce sont des micro-organismes connus pour être capables de produire du méthane à partir de dioxyde de carbone. De plus, les représentants des méthanogènes sont retrouvés sur une large gamme de températures allant de 0°C (*Methanogenium frigidum*) à 110°C (*Methanopyrus kandleri*). Le caractère extrêmophile peut aussi dépendre du pH ou de la concentration en sels. Nous pouvons citer d'une part les acidophiles dont le développement est strictement dépendant des pH acides (inférieur à 3 pour les acidophiles extrêmes et entre 3 et 5 pour les acidophiles modérés) et d'autre part, les halophiles qui requièrent un environnement riche en sels (concentration de NaCl de 6 M pour la mer Morte et de 1,5 M pour le lac Mono). La liste des extrêmophiles s'étend aussi aux métallotolérants, oligotrophes et radiorésistants.

C-La valeur ajoutée des extrêmophiles

Finalement, si l'étude des extrêmophiles est passionnante du point de vue de leur physiologie et dans l'optique de comprendre les mécanismes impliqués dans leur croissance sous ces conditions drastiques, une autre raison d'ordre pratique est à évoquer. En effet, leur apports biotechnologiques leur confèrent une valeur commerciale. Pour exemple, la découverte de la bactérie thermophile *T. aquaticus* est à associer directement à la découverte d'une ADN polymérase thermostable, la Taq polymérase, qui a permis le développement de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Brock et Freeze, 1969 ; Chien *et al.*, 1976). D'autres avantages biotechnologiques sont envisagés comme par exemple l'emploi d'un promoteur

sensible à la température de l'euryarchée hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* afin de produire en grande quantité des protéines d'intérêt (Basen *et al.*, 2012). Les protéines issues d'extrêmophiles représentent à elles seules une grande source de biomolécules utiles à l'industrie agro-alimentaire ou pharmaceutique (Rothschild et Mancinelli, 2001).

D- Les archées, des microbes qui nous ressemblent

Les organismes du domaine des *Archaea* illustrent parfaitement le proverbe : « L'habit ne fait pas le moine ». En effet, si les archées sont morphologiquement proches des représentants du domaine des *Bacteria*, elles partagent avec les eucaryotes de nombreux aspects de la biologie moléculaire fondamentale. Par exemple, les processus informationnels tels que la transcription, la réplication et la division cellulaire illustrent cette proximité entre les archées et les eucaryotes.

1/ Réplication et division cellulaire

Chez les archées, l'étude du cycle cellulaire s'est principalement faite chez des membres du genre *Sulfolobus*. Des études de cytométrie en flux menées chez ce type d'organismes révèlent que, comme les eucaryotes, ils ont un cycle cellulaire dans lequel les phases correspondant à la mitose (M) et la réplication de l'ADN (S) sont séparées par des phases G (*gap*) (Bernander et Poplawski, 1997). Il a également été montré que le cycle cellulaire de *S. acidocaldarius* et *S. solfataricus* est dominé par la phase post-réplivative G2 alors que la phase pré-réplivative G1 est très courte (Bernander et Poplawski, 1997). Précisément, la durée de la phase pré-réplivative est de l'ordre de 5 minutes voire moins pour un cycle cellulaire de *S. acidocaldarius* estimé à 180 minutes (Duggin *et al.*, 2008).

Les tests de sensibilité des archées à l'aphidicoline, un inhibiteur spécifique de l'ADN polymérase α eucaryote, ont permis de mettre en évidence un premier point de rapprochement entre le processus de réplication chez les eucaryotes et celui chez les archées. En effet, lorsque l'archée halophile *Halobacterium halobium* est mise en présence d'aphidicoline, la synthèse d'ADN est immédiatement inhibée ce qui suggère que l'ADN polymérase réplivative d'archée soit de type eucaryote (Forterre *et al.*, 1984). Néanmoins, chez les *Euryarchaeota* une ADN polymérase supplémentaire non homologue à celle des eucaryotes,

l'ADN polymérase PolD, est présente. Aussi, plusieurs études de protéines impliquées dans la réplication de l'ADN des archées ont montré que la machinerie de réplication des archées est homologue à celle des eucaryotes (Kelman et White, 2005 ; Barry et Bell, 2006 ; Chia *et al.*, 2010). A l'heure actuelle, seules les études des protéines impliquées dans l'initiation de la réplication apportent des informations quant à leur fonction physiologique et à leur participation dans le contrôle cellulaire. En effet, il a été montré chez les euryarchées *Halobacterium* NRC-1 et *Pyrococcus abyssi* que l'initiation de la réplication peut se faire à partir d'une seule origine de réplication par chromosome (Myllykallio *et al.*, 2000 ; Matsunaga *et al.*, 2001) comme c'est souvent le cas chez les bactéries. *A contrario*, plusieurs espèces d'archées, dont le genre *Sulfolobus*, présentent plusieurs origines de réplication par chromosome (Robinson *et al.*, 2004 ; Lundgren *et al.*, 2004 ; Norais *et al.*, 2007). En effet, chez *Sulfolobus* sp. la réplication des chromosomes est initiée au niveau de trois origines de réplication : *oriC1*, *oriC2* et *oriC3* ; la fourche de réplication progresse à un taux similaire à celui des eucaryotes soit entre 80 et 110 paires de bases par seconde (Lundgren *et al.*, 2004). Chaque origine de réplication est reconnue soit par une protéine initiatrice spécifique de la famille Orc1-Cdc6 (origin recognition complex 1-cell division cycle 6) soit par la protéine WhiP (Robinson *et al.*, 2004 ; Robinson et Bell, 2007). Les premières montrent des homologies à la fois aux protéines eucaryotes de la famille ORC et aux protéines eucaryotes CDC6 alors que la protéine WhiP, spécifique des *Crenarchaeota*, présente une similarité de séquence avec le facteur de réplication eucaryote Ctd1. Du fait que chez les archées la transcription et la traduction soient couplées (French *et al.*, 2007) et que les gènes codant chaque protéine initiatrice soient immédiatement situés à côté des origines de réplication de *Sulfolobus* (She *et al.*, 2001 ; Robinson *et al.*, 2004 ; Robinson et Bell, 2007), il est possible d'imaginer que chaque protéine initiatrice se lie à l'origine qui leur est adjacente. En effet, l'initiation au niveau de *oriC1* nécessite la protéine Orc1-1, Orc1-3 est requise pour *oriC2* et la protéine WhiP active l'initiation de *oriC3* (Samson *et al.*, 2013).

Récemment, le système de ségrégation des Sulfolobales fut identifié comme étant le système Seg AB (Kalliomaa-Sanford *et al.*, 2012). Ce système faisant intervenir deux gènes, *segA* et *segB*, semble être phylogénétiquement restreint à l'ordre des Sulfolobales suggérant alors d'autres mécanismes de ségrégation des chromosomes pour les autres organismes. Le fait que le gène *segA* présente environ 30% d'identité avec les gènes *parA* présents chez les bactéries (Kalliomaa-Sanford *et al.*, 2012) laisse à penser que le système de ségrégation des Sulfolobales se rapproche de celui des bactéries contrastant avec la machinerie de réplication largement similaire à celle des eucaryotes (Bernander, 2007).

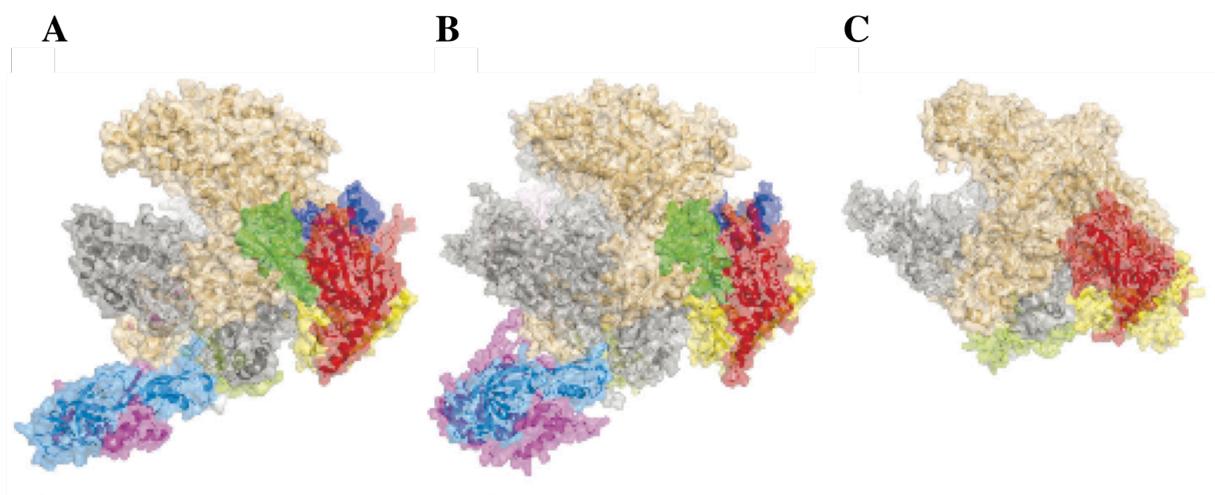


Figure 5- Structures aux rayons X des sous-unités des ARN polymérases de chacun des trois domaines du vivant.

A) L'ARN polymérase d'archée de *Sulfolobus solfataricus*. B) L'ARN polymérase II eucaryote de *Saccharomyces cerevisiae*. C) L'ARN polymérase bactérienne de *Thermus aquaticus*. Les sous-unités qui composent l'ARN polymérase core-enzyme sont retrouvées dans les trois domaines du vivant et sont données suivant la nomenclature bactérienne. Le code couleur est le suivant : une sous-unité α en jaune ; la seconde en rouge ; la sous-unité β en beige et la sous-unité β' en gris.

D'après les structures des trois ARN polymérases, certaines sous-unités sont uniquement partagées entre l'ARN polymérase d'archée et l'ARN polymérase II eucaryote : la sous-unité P en vert; la sous-unité N en bleu et la sous-unité F en rose. La nomenclature de ces trois sous-unités est celle des archées. Ces images sont issues de (Werner, 2008).

En ce qui concerne la machinerie de division cellulaire des Sulfolobales mais aussi des Desulfurococcales, ces derniers n'ont pas d'homologue de FtsZ ni d'actine mais codent des paralogues du complexe ESCRT-III ainsi qu'un homologue de Vps4 (Samson *et al.*, 2008 ; Lindås *et al.*, 2008). Chez les eucaryotes, l'ATPase Vps4 facilite le recyclage du complexe ESCRT, complexe qui médie les évènements de scission de la membrane. Récemment, il a été montré *in vitro* comme *in vivo* que le recrutement du complexe ESCRT-III aux membranes de *Sulfolobus* est médié spécifiquement par la protéine CdvA (Samson et Bell, 2011).

Du point de vue des processus majeurs du cycle cellulaire, les archées sont des organismes qui peuvent être qualifiés de mosaïques car ils présentent à la fois des traits propres aux bactéries, aux eucaryotes mais également spécifiques des archées.

2/ Transcription

La transcription est la première étape de l'expression des gènes au cours de laquelle l'enzyme impliquée est l'ARN polymérase et ce quel que soit le domaine du vivant considéré. Les premières études de la transcription chez les archées ont principalement été menées par l'équipe de Wolfram Zillig. Contrairement aux eucaryotes qui possèdent trois ARN polymérases spécialisées (ARN polymérase I, ARN polymérase II et ARN polymérase III), les archées possèdent une seule ARN polymérase comme les bactéries. Les études portant sur la sensibilité de l'ARN polymérase d'archée à différents antibiotiques ne permettaient pas d'aboutir à une parenté claire. En effet, si l'ARN polymérase d'archée est insensible à la rifampicine contrairement à l'ARN polymérase bactérienne (Zillig *et al.*, 1978), elle est également insensible à l' α amanitine, un antibiotique qui inhibe fortement l'ARN polymérase de type II eucaryote et plus faiblement l'ARN polymérase III. Ainsi, l'hypothèse d'une proximité évolutive entre les eucaryotes et les archées (Zillig *et al.*, 1978) ou entre les bactéries et les archées était difficile à formuler. Du point de vue de la complexité structurale, notamment du nombre de sous-unités, l'ARN polymérase d'archées rappelle celle des eucaryotes. En effet, les premières études portant sur l'ARN polymérase du *crenarchaeon* *Sulfolobus acidocaldarius* ont montré qu'elle était constituée de 11 à 13 sous-unités différentes alors que l'ARN polymérase bactérienne ne contient que 4 sous-unités différentes ($\alpha_2\beta\beta'$ et le facteur σ) (Figure 5A). Deux approches immunologiques menées en 1983 mirent en évidence d'une part que les sous-unités des ARN polymérases d'espèces différentes d'archées sont similaires entre elles et d'autre part, que l'ARN polymérase d'archées

présentent des similarités de séquences protéiques avec les sous-unités des ARN polymérases I et II eucaryotes (Schnabel *et al.*, 1983 ; Huet *et al.*, 1983). De plus, l'appareil basal de transcription des archées est très similaire à celui des eucaryotes (Zillig *et al.*, 1988 ; Langer *et al.*, 1995). Des études structurales combinées à des études biochimiques montrent que le système de transcription des archées est plus proche d'un point de vue moléculaire de celui des eucaryotes que de celui des bactéries (Figure 5) (pour une revue Werner, 2008 ; Jun *et al.*, 2011). L'activation des promoteurs eucaryotes de type II nécessite l'interaction d'une protéine, la TBP (*TATA-binding protein*) ou TFIID, sur une séquence consensus symétrique riche en A+T, appelée la boîte TATA, située entre 25 et 30 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. Une telle séquence a été mise en évidence *in vitro* en 1990 chez le *crenarchaeon Sulfolobus shibatae* suggérant une proximité évolutive entre les eucaryotes et les archées du point de vue de l'initiation de la transcription (Hüdepohl *et al.*, 1990). D'autre part, l'analyse du génome de *Thermococcus celer* permet d'identifier des séquences pouvant produire un facteur de transcription proche de la TBP eucaryote (Marsh *et al.*, 1994). La machinerie de transcription des *Archaea* est donc homologue à celle responsable de la synthèse des ARN messagers des *Eucarya*, au moins du point de vue du complexe ternaire TBP-TFB-ARN polymérase holoenzyme d'archée (Rowlands *et al.*, 1994 ; Qureshi *et al.*, 1995 ; Langer *et al.*, 1995 ; Qureshi *et al.*, 1997). Il faut cependant apporter un petit bémol concernant cette proximité entre eucaryotes et archées. En effet, si l'appareil de transcription de base est proche de celui des eucaryotes, il semble que les régulateurs de transcription se rapprochent le plus souvent de ceux des bactéries (Doolittle et Logsdon, 1998 ; Jun *et al.*, 2011).

Ainsi, bien que le système de transcription des archées ne soit pas entièrement compris, il peut être considéré comme un système hybride avec un appareil de transcription de type eucaryote et des mécanismes de régulation de type bactériens.

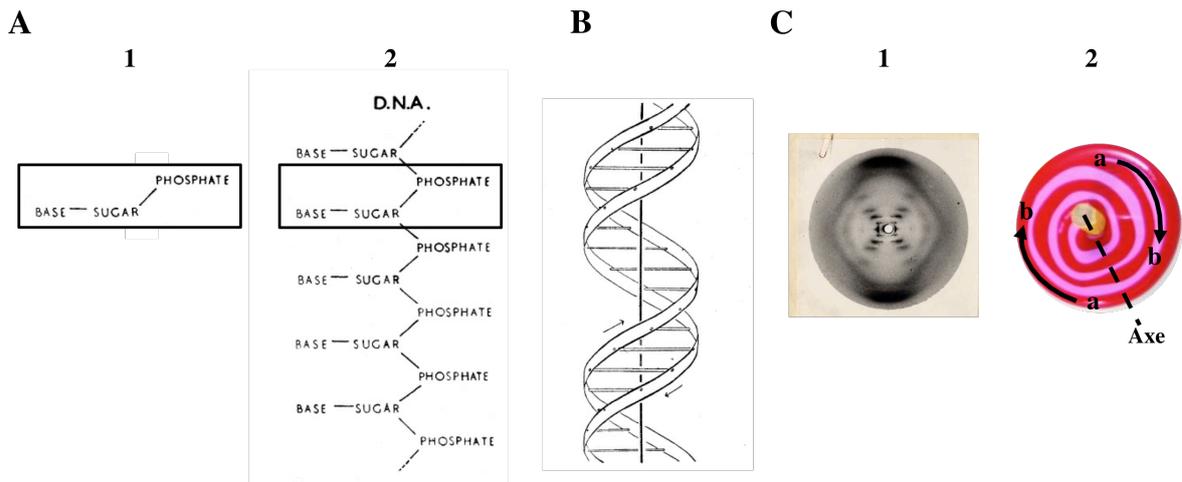


Figure 6- La molécule d'ADN-B.

A) Schéma d'un ADN simple brin proposé par Watson et Crick en 1953 (Watson et Crick, 1953a). Un nucléotide (1) est composé d'un phosphate, d'un sucre (*sugar*) et d'une base azotée. Les nucléotides s'enchaînent *via* des liaisons phosphodiesters entre des sucres et des groupements phosphates pour former une simple chaîne d'ADN (2). **B)** Modèle de la double hélice proposé par Watson et Crick en 1953 (Watson et Crick, 1953b). **C)** ADN de type B. Image de diffraction aux rayons X de fibres d'ADN (1) publiée dans (Franklin et Gosling, 1953). Par l'exemple de la toupie (2), les deux brins d'ADN tournent dans le sens des aiguilles d'une montre de a vers b autour de l'axe de la double hélice est c'est ce qui caractérise une hélice droite ou ADN-B.

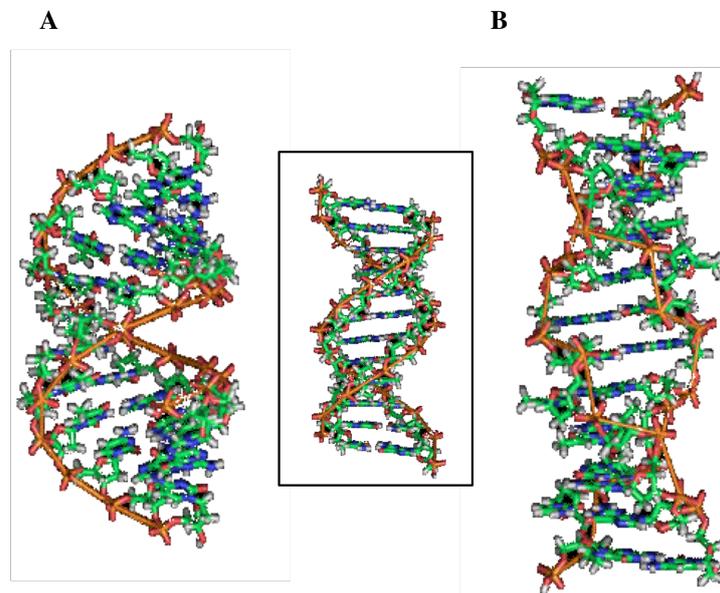


Figure 7- Représentation des molécules d'ADN-A, d'ADN-Z et d'ADN-B.

L'ADN-A (A) est plus court et plus large que l'ADN-B. L'axe passe dans le grand sillon et le pas est de 11 paires de base par tour. L'ADN-Z (B) est une double hélice gauche dont l'axe passe par le petit sillon et le pas est de 12 paires de base par tour. Pour faciliter la comparaison de ces deux représentations, l'ADN-B est inclus dans l'encadré au centre de la figure. L'ADN-B est une hélice droite caractérisée par un pas de 10,6 paires de base par tour. Images d'après le site internet de l'université d'Angers (<http://biochimj.univ-angers.fr>).

II- Topologie de l'ADN : un jeu d'enfant

A- Définitions

1/ Molécule d'ADN

Considérons la structure primaire d'un brin d'acide désoxyribonucléique (ADN). Il s'agit d'une succession de monomères que l'on peut représenter alors comme des briques élémentaires. Ces dernières sont appelées nucléotides et mettent en jeu un groupement phosphate lié par une liaison phosphoester à un sucre (le 2' désoxyribose) lui-même lié à une base azotée hétérocyclique par une liaison N-glycosidique (Figure 6A-1). Chaque nucléotide ou « brique » s'enchaîne les uns aux autres *via* des liaisons phosphodiester entre les sucres et les groupements phosphates pour former un brin d'ADN comme ce qui est présenté à la Figure 6A-2 (Watson et Crick, 1953a). Selon la structure de la double hélice d'ADN modélisée par Watson et Crick en 1953, deux molécules d'ADN simple brin tournent l'une autour de l'autre régulièrement créant au centre un axe. Cet enroulement se fait par complémentarité des bases azotées formant alors un centre hydrophobe et exposant le squelette désoxyribose – phosphate hydrophile au solvant (Figure 6B) (Watson et Crick, 1953a). Les images de la diffraction aux rayons X de fibres d'ADN obtenues cette même année (Wilkins *et al.*, 1953) permettent de valider le modèle d'ADN-B de Watson et Crick (Figure 6C-1). Cette notion d'hélice « droite » se définit par le sens de rotation des deux brins autour de l'axe de la double hélice. Pour visualiser les choses, prenons une toupie bicolore qui correspondrait à une double hélice droite vue du dessus (Figure 6C-2). L'axe de la double hélice est représenté par l'axe de la toupie et les deux brins entrelacés correspondent aux deux couleurs. Si vous suivez chaque couleur de l'extérieur vers le centre de la toupie (sens des flèches du point a vers le point b), le chemin tracé tourne dans le sens des aiguilles d'une montre soit dans un sens positif (Figure 6C-2). Ce sens de rotation des deux brins caractérise une hélice droite. Bien que cette molécule biologique semble structurellement figée, il n'en est rien. En effet, d'autres études de diffraction aux rayons X de cristaux d'ADN ont permis de mettre en évidence d'autres conformations, notamment deux autres types de double hélice : l'ADN-A et l'ADN-Z (Figure 7). La première est caractérisée par le fait que le centre des paires de bases est décentré de l'axe de la double hélice par rapport à l'ADN-B alors que la seconde est une hélice gauche (Figure 7). L'ADN-B peut aussi adopter des conformations différentes au sein même de sa structure soit par un faible changement local du pas de la double hélice, soit par des appariements de bases complémentaires d'un même brin formant

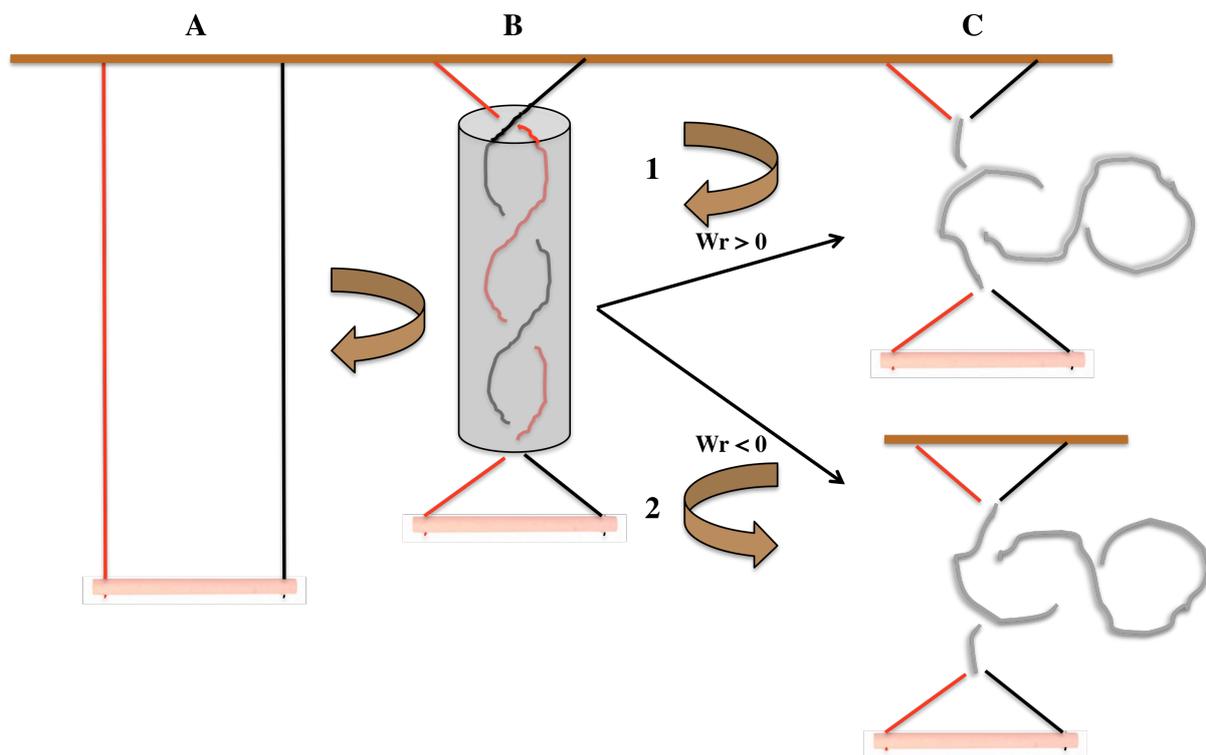


Figure 8- L'exemple de la balançoire.

A) Le siège de la balançoire est fixé au portique immobile (en marron) à l'aide d'une corde rouge et d'une corde noire. Cet état constitue l'état stable **A**. **B)** Formation d'une double hélice droite par rotation dans le sens des aiguilles d'une montre du siège. La double hélice ainsi formée est symbolisée par le cylindre gris et constitue l'état stable **B**. **C)** Tourner la double hélice dans le sens positif ou négatif génère respectivement des plectonèmes gauche (1) ou droit (2) respectivement. Dans le cas où le portique est fixe, seul le siège est mobile.

ainsi des structures alternatives telles que des structures cruciformes (Bates et Maxwell, 1993).

Lors de la description de la double hélice, Watson et Crick soulignèrent l'implication biologique de l'entrelacement des deux brins dans le cas de la réplication (Watson et Crick, 1953a ; Watson et Crick, 1953b). Ce processus nécessite l'ouverture de la double hélice, étape qui engendre des contraintes topologiques entre les deux brins qu'il sera nécessaire d'éliminer pour que les machineries puissent progresser sur l'ADN. Ces variations locales d'entrelacements ont pour conséquence de modifier localement la géométrie de l'ADN. Une nouvelle discipline portant sur l'étude des variations des entrelacements des deux brins d'ADN voit alors le jour : la topologie de l'ADN.

2/ Les grandeurs topologiques

Afin de mieux comprendre la signification des notions intervenant dans les variations de topologie, revenons sur la double hélice d'ADN-B. Pour ce faire, je vous propose l'exemple d'une balançoire présenté en Figure 8. Dans un premier temps, les deux cordes parallèles qui rattachent le siège (élément mobile) au portique (élément immobile) représentent les deux brins complémentaires orientés dans le sens 5'-3' d'une part et 3'-5' d'autre part (Figure 8A). Cette configuration constitue un état stable noté « état stable A ». Dans un deuxième temps, tournons le siège dans le sens des aiguilles d'une montre (sens positif) afin de former une double hélice droite dont la structure relativement stable (« état stable B ») sera considérée dans la suite de l'exemple (Figure 8B).

A partir de cette hélice droite nous pouvons définir le paramètre d'enroulement qui correspond au nombre de fois qu'un brin tourne autour de l'axe de la double hélice (T_w pour *Twisting* qui signifie « torsion »). Ce paramètre géométrique est directement dépendant de la longueur de l'ADN, exprimée en paire de bases (N), et du pas de la double hélice (h) qui correspond au nombre de paire de bases nécessaire pour faire un tour d'hélice. Dans des conditions standards (0,2M NaCl, pH7, 25°C) le pas d'un ADN-B est estimé à 10,4 pb/tour (Duguet, 1993) mais celui-ci peut varier en fonction de différents paramètres comme la température, le pH ou la force ionique. La dépendance directe entre le pas de la double hélice et la valeur d'enroulement a pour conséquence de moduler cette valeur d'enroulement. L'impact de la température sur le pas de la double hélice puis sur la valeur d'enroulement est détaillé dans le chapitre IV « Thermophilie et Reverse gyrase » de l'introduction.

La géométrie particulière de la double hélice dépend également d'un second paramètre géométrique. Il s'agit de la valeur de surenroulement (W_r pour *Writhe* qui signifie « vrillage ») qui décrit comment l'axe de la double hélice s'enroule autour de lui-même. Pour illustrer cette déformation de l'axe, partons de l'état stable B et tournons encore le siège de 360° dans le sens positif (Figure 8C-1). Ainsi, le niveau d'entrelacement augmente et l'accumulation d'énergie induite déforme l'axe de la double hélice. Dans ce cas, la modification du W_r se traduit par la formation d'une super hélice gauche, ou supertour positif. *A contrario* et toujours en partant de l'état stable B, si le siège tourne de 360° dans le sens inverse des aiguilles d'une montre, l'axe de la double hélice sort du plan pour former une super hélice droite, ou supertour négatif (Figure 8C-2). L'accumulation des contraintes est possible parce que le couple d'extrémités associées au portique n'est pas libre de rotation et parce que les rotations des deux brins fixés au niveau du siège sont contrôlées. Pour se rendre compte de l'énergie accumulée, plaçons nous dans le cas où un supertour positif est créé et lâchons le siège jusqu'à atteindre l'état stable B. Les contraintes vont se dissiper rapidement. Dans la cellule, la formation de surenroulement permet d'accumuler de l'énergie au sein d'une molécule d'ADN topologiquement contrainte c'est-à-dire que les extrémités ne sont pas libres de rotation. Le nombre de liens topologiques (L_k) correspond au nombre de fois qu'un brin tourne autour de l'autre. La valeur de L_k définit une propriété topologique car il s'agit de la somme des deux paramètres géométriques précédemment décrits (T_w et W_r). Dans le cadre d'une molécule topologiquement contrainte le L_k est un invariant avec : $L_k = T_w + W_r$. Une conséquence importante de l'invariance du L_k est que les deux paramètres géométriques sont interdépendants. Si un des deux paramètres géométriques varie, l'autre change en conséquence. La variation du nombre de liens topologiques au sein d'une molécule d'ADN topologiquement contrainte se traduit donc nécessairement par l'apparition d'une coupure transitoire dans la molécule d'ADN.

B- Etat du chromosome in vivo

Prenons le cas d'une molécule d'ADN dont l'état topologique est relâché c'est-à-dire que la valeur de surenroulement est nulle ($W_r \approx 0$). Selon la relation $L_k = T_w + W_r$ qui décrit l'état topologique d'une molécule d'ADN, le nombre de liens topologiques est alors égal à la valeur d'enroulement : $L_k \approx T_w$ et se note L_k^0 . Cette valeur de L_k^0 représente l'état topologique de l'ADN de moindre énergie et constitue donc le point de référence pour la mesure du niveau de surenroulement. Le nombre de liens topologiques d'une molécule d'ADN peut varier en réponse à différentes conditions ce qui se traduit par un déficit ou un excès de nombre de liens topologiques. Cela s'exprime par les déviations du nombre de liens topologiques L_k : $\Delta L_k = L_k - L_k^0$. Le rapport du nombre de liens topologiques d'une molécule dans un état surenroulé et celui dans un état relâché $\Delta L_k / L_k^0$ nous permet de s'affranchir de la longueur de l'ADN considéré en obtenant une mesure de la densité de surenroulement (σ) ce qui permet de comparer des molécules d'ADN topologiquement contraintes quelle que soit leur longueur. Dans une démarche comparative du niveau de surenroulement global, il est important d'avoir accès à la notion de densité de surenroulement globale étant donné que la longueur des génomes est variable.

De manière générale, il est difficile d'avoir accès au niveau de surenroulement total du chromosome du fait de ses interactions avec des protéines ou d'autres composants cellulaires. De ce fait, le surenroulement des plasmides (éléments extrachromosomiques) peut être assimilé à un indicateur de la topologie intracellulaire. Les ADN eucaryote et bactérien sont surenroulés négativement et les valeurs de densité de supertours rapportées s'étendent de -0,03 à -0,09 (Bauer, 1978). Une étude de la densité de supertours de plasmides issus de bactéries et d'archées mésophiles et thermophiles permet de distinguer deux groupes (Charbonnier et Forterre, 1994). Le groupe I se rapporte aux plasmides hautement surenroulés négativement isolés à partir d'archées mésophiles et de bactéries mésophiles ou thermophiles. Quant au groupe II, il est composé de plasmides relâchés appartenant exclusivement aux archées thermophiles. Cette étude est à compléter avec celle de 1997 où il est clairement montré que les plasmides issus d'archées hyperthermophiles de l'ordre des Thermococcales et des Sulfolobales sont majoritairement surenroulés positivement (López-García et Forterre, 1997).

L'ADN eucaryote comme bactérien est structuré sous forme de domaines topologiquement contraints indépendants les uns des autres (Travers et Muskhelishvili, 2005). Il y a plusieurs années et plus récemment, des observations en microscopie

électronique de boucles d'environ 10 kilobases au sein du chromosome d'*Escherichia coli* ont permis de mettre en évidence ces domaines topologiques fonctionnels (Postow *et al.*, 2004). L'introduction de coupures dans l'ADN au niveau de sites particuliers a montré que l'expression de gènes proches de ces sites est inhibée alors que celle de gènes distants n'est pas altérée. Cela indique clairement que des barrières topologiques limitant la diffusion libre des supertours existent et structurent l'ADN (Postow *et al.*, 2004). En ce qui concerne la géométrie des supertours, une étude de la torsion de la double hélice d'ADN par ajout de triméthylpsoralen montre que le chromosome bactérien (*E. coli*) est principalement organisé en plectonèmes libres alors que celui des eucaryotes (cellules d'insectes et humaines) adoptent essentiellement une forme toroïdale du fait de la contrainte induite par les nucléosomes (Sinden *et al.*, 1980).

Pour résumer, bien que les ADN bactériens et eucaryotes soient globalement surenroulés négativement, en termes de compaction la principale différence entre ces deux domaines du vivant est la proportion relative de supertours sous forme de toroïdes (supertours contraints) et de plectonèmes (supertours libres) (Travers et Muskhelishvili, 2007). Pour ce qui est des archées, celles-ci arborent une densité de surenroulement allant du négatif au positif suivant la température de croissance et, les géométries de l'ADN adoptées sont différentes suivant le *phylum* considéré.

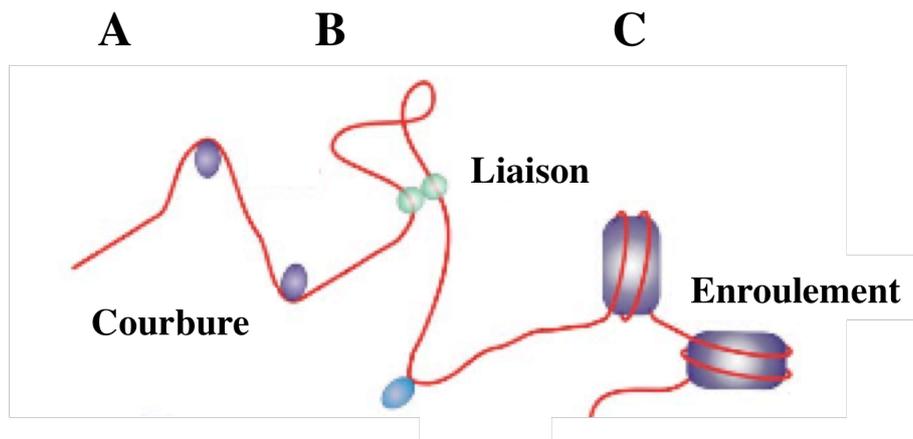


Figure 9- **Trois catégories de protéines chromosomales de l'ADN.**

A) Les protéines courbant l'ADN sont symbolisées par les ovales violet et bleu. **B)** Les protéines liant deux duplexes d'ADN sont représentées par des bulles vertes. **C)** Les protéines enroulant l'ADN sont schématisées par des disques violets. La double hélice d'ADN est symbolisée par le trait rouge. Image adaptée issue de la revue (Luijsterburg *et al.*, 2008).

C- Modulateurs de topologie

1/ Protéines chromosomales : effet statique sur l'ADN

Le modèle de la double hélice proposé par Watson et Crick montre un ADN nu et rectiligne alors que dans une cellule, cette molécule est retrouvée compactée, entre autre, par son interaction avec des protéines chromosomales. Ces protéines, en ayant différents effets structuraux sur l'ADN, peuvent alors être classées selon trois catégories. Certaines protéines lient, d'autres enroulent et certaines courbent la double hélice d'ADN (Figure 9). Les protéines qui réalisent des liaisons dynamiques entre des duplexes d'ADN ou des complexes ADN-protéines chromatiniennes ne seront pas développées dans cette thèse à l'inverse des protéines qui enroulent et celles qui courbent l'ADN.

Dans la catégorie des protéines qui enroulent l'ADN, nous retrouvons quatre dimères de protéines histones : H2A ; H2B ; H3 et H4 qui forment les nucléosomes eucaryotes. Les hétérodimères de protéines histones de cœur (H3-H4)₂, ou tétrasome, sont flanqués de deux hétérodimères (H2A et H2B). Ce sont alors environ 150 paires de bases d'ADN qui entourent négativement cet octamère (Arents *et al.*, 1991 ; Luger *et al.*, 1997). La découverte, *in vitro* des protéines histones chez les archées s'est faite initialement chez les méthanogènes avec les deux protéines HMfA et HMfB (HMf pour Histone *Methanothermus fervidus*) (Sandman *et al.*, 1990). Deux ans plus tard, des complexes ADN-protéines histones ont été mis en évidence *in vivo* chez une espèce d'*Halobacterium* (Takayanagi *et al.*, 1992). L'étude des protéines histones chez les archées s'est étendue par la suite à d'autres euryarchées puis au *phylum* des *Nanoarchaeota* (Brochier *et al.*, 2005) et enfin à celui des *Thaumarchaeota* (Cubonová *et al.*, 2005). En résumé, il apparaît clairement que les protéines histones homologues à celles des eucaryotes sont retrouvées chez toutes les archées, à l'exception des *Crenarchaeota* et des Thermoplasmatales, appartenant aux *Euryarchaeota*. Les nucléosomes d'archées ressemblent au tétrasome eucaryote (H3-H4)₂ autour duquel sont enroulées environ 90 paires de bases (pour revue voir Reeve *et al.*, 1997 ; Decanniere *et al.*, 2000). Pour ce qui est de la contrainte qu'induisent les nucléosomes chez les archées, il a été montré initialement que les supertours de la double hélice sont positivement contraints (Musgrave *et al.*, 1991 ; Grayling *et al.*, 1996). Cependant, le surenroulement au sein des nucléosomes dépend de la température, de la force ionique et des modifications dans certains résidus clés de l'interface deux dimères (H3-H4). En effet, pour l'exemple de la température, lorsque celle-ci augmente, les supertours ne sont plus contraints positivement mais négativement (Musgrave *et al.*, 2000).

Le fait que certaines conditions d'analyse favorisent une contrainte positive plutôt que négative, ou l'inverse, a également été observé pour les nucléosomes eucaryotes (Hamiche *et al.*, 1996). Il n'y a pas de démonstration de rôle *in vivo* pour les protéines histones chez les *Archaea*. Néanmoins, les délétions individuelles de quatre gènes codant quatre protéines chromatiniennes (HstA, HstB, HmvA et Alba) de *Methanococcus voltae* montrent d'une part que ces quatre protéines ne sont pas essentielles et d'autre part que la composition protéique des nucléosomes semble importante dans l'expression des gènes (Heinicke *et al.*, 2004). Plus récemment, une étude menée chez l'euryarchée *Thermococcus kodakaraensis* démontre l'importance pour la cellule de posséder au moins un gène codant une protéine histone (soit HTkA, soit HTkB) puisque le double mutant est létal. De plus, il semblerait que les deux protéines histones soient impliquées dans des processus cellulaires différents. En effet, la protéine histone HTkA serait impliquée dans le processus de transformation de l'euryarchaeon alors que la protéine histone HTkB semble être importante pour la croissance (Cubonova *et al.*, 2012).

Si l'ADN des eucaryotes et des *Euryarchaeota* est principalement compacté par les nucléosomes, il n'en est rien pour les bactéries, les Thermoplasmatales et les *Crenarchaeota*. En effet, la compaction de l'ADN fait intervenir d'autres protéines chromatiniennes, des petites protéines basiques qui compactent l'ADN ou le courbent (White et Bell, 2002 ; Luijsterburg *et al.*, 2008). Chez les archées, des protéines apparentées à la famille des protéines bactériennes HU (Rouviere-Yaniv et Gros, 1975), protéines qui se dimérisent et courbent l'ADN selon un angle d'environ 160°, sont retrouvées chez les Thermoplasmatales et furent les premières protéines chromatiniennes des archées décrites (DeLange *et al.*, 1981). Il est intéressant de noter que les Thermoplasmatales, appartenant au *phylum* des *Euryarchaeota*, sont les seuls représentant de ce règne qui ne possèdent pas de protéines histones. Attention, cet exemple n'est pas une généralité et ne signifie pas qu'il est impossible de retrouver au sein d'une même cellule un mélange de protéines chromatiniennes. L'espèce *M. kandleri*, par exemple, possède des protéines de type histones (MkaH ou HMk) ainsi que trois autres protéines chromatiniennes (kMk) différant par leurs masses moléculaires (environ 7, 10 et 30 kDa) (Pavlov *et al.*, 2002). La caractérisation de la protéine chromatinienne 7 kDa de *M. kandleri* a montré que le complexe 7 kMk-ADN peut se faire selon deux modèles de liaison. Dans le premier cas, les protéines 7 kMk s'oligomérisent pour former une structure de type nucléosome autour de laquelle l'ADN s'enroule négativement

alors que dans le second cas, la fixation d'une protéine 7kMk sur l'ADN se fait de manière coopérative ce qui forme une boucle dont la superhélicité est négative (Pavlov *et al.*, 2002). La protéine Alba (*acetylation lower DNA-binding affinity*), ou Sul10b chez les Sulfolobales, est largement distribuée au sein des archées. Les deux protéines Alba1 et Alba2 se dimérisent pour se lier coopérativement à l'ADN, le contraignant négativement (Xue *et al.*, 2000 ; Jelinska *et al.*, 2005). Il a récemment été montré que Alba1 et Alba2 présentent des propriétés différentes et sont donc deux protéines différentes (Črnigoj *et al.*, 2013).

Il est aussi possible de retrouver des protéines chromatinienne dont la distribution phylogénétique est limitée. En effet, chez les *Euryarchaeota* méthanogènes les protéines MC1 (*methanogen chromosomal protein 1*) lient l'ADN double brin de manière non coopérative formant un angle de 116° pour un ratio de 5 MC1 par ADN d'environ 170pb (Le Cam *et al.*, 1999). L'originalité de cette protéine chromatinienne est que sa liaison à l'ADN s'effectue sur des structures d'ADN particulières telles que des courbures aussi retrouvées au niveau des jonctions d'ADN à quatre branches (Teyssier *et al.*, 1994 ; Teyssier *et al.*, 1996 ; De Vuyst *et al.*, 2005). Les *Crenarchaeota* possèdent également leurs propres protéines chromatiniennes. La protéine Sul7d est le nom générique donné à la famille des protéines de 7 kDa, très abondantes (environ 5% des protéines totales) et hautement conservées au sein des Sulfolobales. Son interaction avec le petit sillon de l'ADN permet l'introduction de supertours négatifs (Agback *et al.*, 1998 ; López-García *et al.*, 1998 ; Napoli *et al.*, 2002). Si cette famille de protéine Sul7d a une distribution limitée d'un point de vue phylogénétique à l'ordre des Sulfolobales, la protéine Cren7 est une protéine chromatinienne hautement conservée au sein de l'ensemble des *Crenarchaeota*. Son mode de liaison à l'ADN ainsi que ses propriétés architecturales sont proches de celles de Sul7d (Guo *et al.*, 2007).

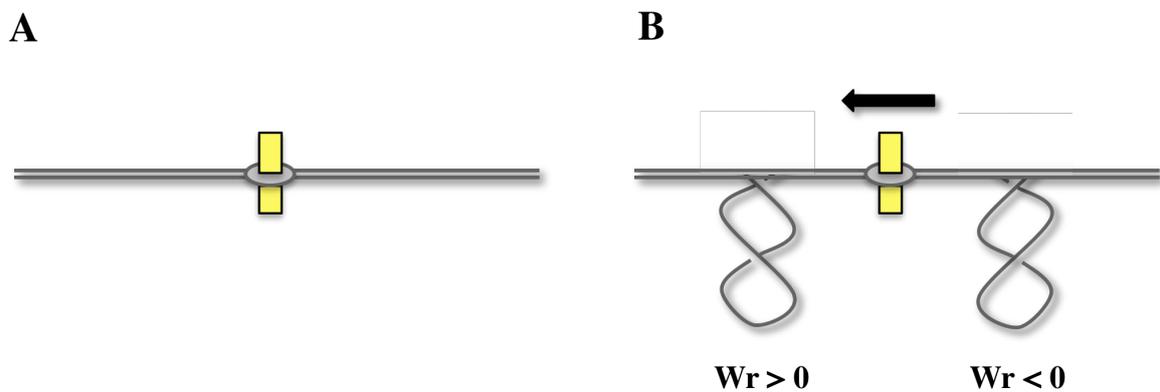


Figure 10- **Schématisation des contraintes topologiques formées lors de l'avancée de la machinerie de transcription.**

A) La machinerie, symbolisée par le rectangle jaune, arrivent sur la double hélice d'ADN (traits gris) et forment le complexe ouvert (cercle gris). **B)** Lorsque la machinerie avancement sur la double hélice d'ADN (progression selon la flèche), un excès de surenroulement est créé en aval ($W_r > 0$) alors qu'un déficit est créé en amont ($W_r < 0$).

2/ Protéines du métabolisme de l'ADN : effet dynamique sur l'ADN

L'ADN est le substrat des réactions de transmission, d'expression et de réparation du patrimoine génétique. Les interactions entre l'ADN et les protéines responsables de ces réactions donnent lieu à des changements dynamiques de la topologie sans pour autant faire varier le nombre de liens topologiques. L'arrivée des machineries de réplication et de transcription sur la double hélice d'ADN illustre parfaitement cette formation locale de contraintes topologiques (Figure 10). Le système de réplication *in vitro* développé par Hiasa et Marians en 1994 montre la formation de deux types de contraintes lors de l'initiation ainsi qu'au cours de l'élongation : l'accumulation de supertours positifs en aval de la fourche et la formation de précaténanes surenroulés négativement en amont (Hiasa *et al.*, 1994). La formation des contraintes topologiques créées lors de la réplication est en partie analogue à celle de la transcription. En effet, dans le cadre de la transcription, Liu et Wang en 1987 ont proposé le modèle « *twin supercoiled domain* » où un excès d'entrelacements est créé en aval alors qu'un déficit est observé en amont (Liu et Wang, 1987 ; Wu *et al.*, 1988) (Figure 10). Le complexe entre l'ARN polymérase, l'ARN naissant et la présence des ribosomes, dans le cas d'une transcription couplée à la traduction (French *et al.*, 2007), formerait un complexe trop imposant pour pouvoir tourner autour de l'axe de la double hélice. Ainsi, les machineries seraient fixes et ce serait l'ADN qui effectuerait les rotations. La régulation de ces contraintes est importante car elles sont responsables de l'ouverture de la double hélice et sont donc à l'origine de la formation d'un complexe ouvert, première étape des processus précédemment cités. En effet, dans certains cas une contrainte négative est un pré-requis pour la transcription (Tabuchi et Hirose, 1988 ; Mizutani *et al.*, 1991). De plus, certains facteurs ont des affinités différentes suivant l'état topologique du substrat. Pour ne citer qu'un exemple, les facteurs sigma bactériens σ^{70} et σ^{38} intervenant dans la sélection du promoteur de transcription montrent une différence d'affinité selon que la superhélicité négative de l'ADN soit élevée ou basse (Kusano *et al.*, 1996).

Nous avons vu que les ADN plasmidiques isolés des archées hyperthermophiles sont surenroulés positivement jusqu'à ultra positivement pour l'ADN viral SSV1 (Nadal *et al.*, 1986) ce qui pose la question de l'efficacité de la transcription sur ce type de matrice. En utilisant un système de transcription *in vitro* de Sulfolobales, il a été montré que la transcription de matrices se faisait quelle que soit la topologie pourvu qu'elle soit effectuée à

haute température (75°C). A basse température (48°C), la transcription est impossible sur les ADN surenroulés positivement (Bell *et al.*, 1998). Le blocage vient de l'incapacité à ouvrir la double hélice d'ADN au niveau du site d'initiation, le surenroulement positif s'opposant à l'ouverture de la double hélice, bien que le complexe ternaire ARN polymérase-TFB-TBP soit parfaitement positionné (Bell *et al.*, 1998). L'apport d'énergie emmené par la chaleur est requis pour faciliter l'ouverture des deux brins.

Dans une cellule, la molécule d'ADN est tout sauf libre. En effet, entre les protéines chromatiniennes et celles impliquées dans des processus biologiques touchant à l'ADN, cette dernière apparaît comme contrainte en permanence. Or, ces changements topologiques induits peuvent avoir des conséquences biologiques profondes (Liu et Wang, 1987 ; Postow *et al.*, 2001). Les ADN topoisomérases, de part leur réaction enzymatique, sont des protéines directement impliquées dans la résolution des contraintes topologiques créées lors de ces processus cellulaires.

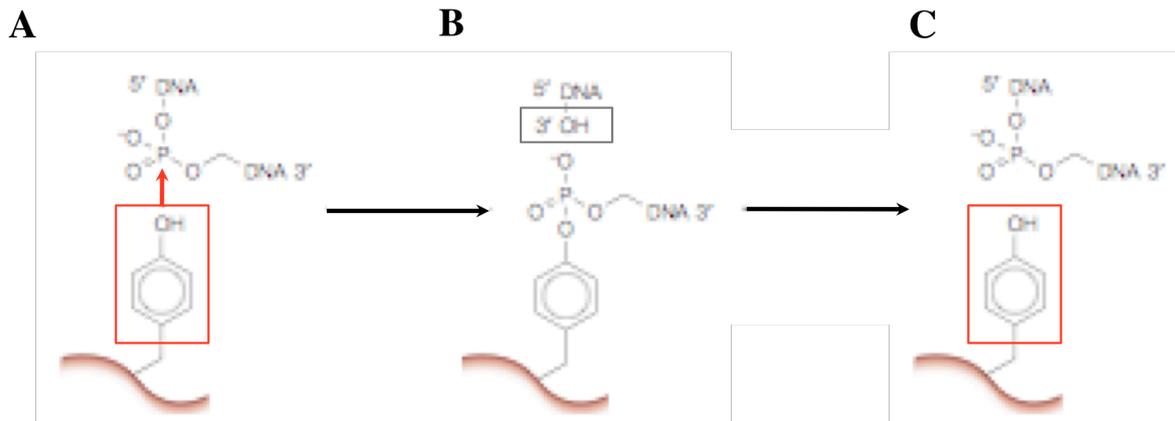


Figure 11- La réaction de trans-estérification.

A) Le groupement tyrosine (encadré en rouge) situé dans le site actif des ADN topoisomérases attaque le groupement phosphate du squelette désoxyribose-phosphate de l'ADN orienté 5'-3'. **B)** La tyrosine forme une liaison covalente avec le groupement phosphate, à l'extrémité 5' dans l'exemple présenté ici, ce qui clive le brin d'ADN (extrémité 3' libre marquée par un encadré gris). C'est à cette étape **B** que s'effectue le passage de brin modifiant ainsi le nombre de liens topologiques de la molécule d'ADN. **C)** Puis, la réaction inverse s'effectue et permet de former à nouveau un brin d'ADN intègre. La réaction de trans-estérification présentée dans cette figure est caractéristique des ADN topoisomérases IA. Image extraite de la revue de (Wang, 2002) et modifiée.

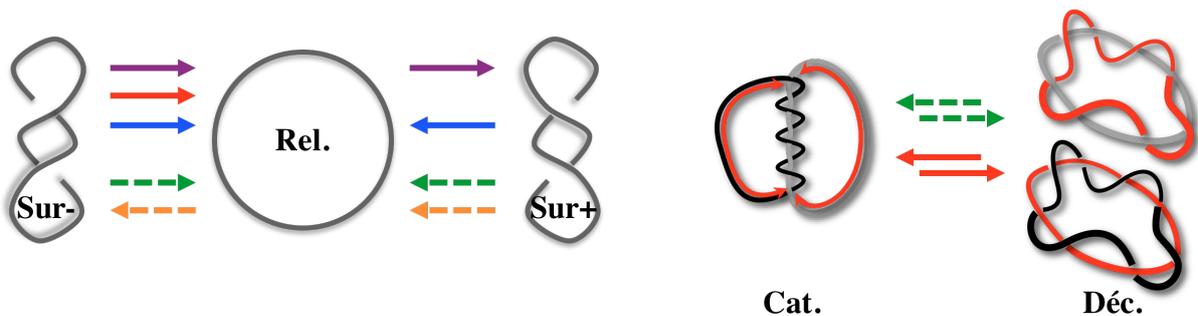


Figure 12- Les substrats et les réactions catalysées par les ADN topoisomérases.

Les différents substrats sont : **Sur-** (ADN surenroulé négativement), **Rel.** (ADN relâché), **Sur+** (ADN surenroulé positivement), **Cat.** (2 duplexes d'ADN caténés) et **Déc.** (2 duplexes d'ADN décaténés).

Les flèches en continu représentent les réactions catalysées par les ADN topoisomérases de type I : les **IA** en rouge dont la **reverse gyrase** en violet et les **IB** en bleu. Les réactions catalysées par les ADN topoisomérases de type II sont symbolisées par les flèches en pointillé : les **IIA** et **IIB** en vert et l'**ADN gyrase** en orange.

III - Le monde magique des ADN topoisomérases

A- D'un point de vue mécanistique

1/ Leur « truc » : la réaction de trans-estérification

Les ADN topoisomérases sont retrouvées chez l'ensemble des organismes vivants et sont des enzymes capables de moduler la topologie de l'ADN en jouant sur le nombre de liens topologiques (Lk). James C. Wang qualifie ce type d'enzymes de « magiciennes » puisqu'elles ont la capacité d'effectuer des transformations topologiques lors des processus cellulaires sans laisser de trace de leur action sur l'ADN. Mais comme tout magicien, ces enzymes ont un « truc ». En effet, la réaction catalysée par les ADN topoisomérases est une réaction de trans-estérification pouvant être décomposée en trois étapes (Figure 11). Premièrement, le groupement tyrosyl de l'enzyme attaque une liaison phosphoester du squelette désoxyribose-phosphate (Figure 11A). Cette attaque aboutit à la formation d'une liaison covalente phospho-tyrosyl coupant ainsi transitoirement un brin d'ADN (Figure 11B). La deuxième étape correspond au passage du brin intact au travers de la coupure générée lors de la première étape. Enfin, une seconde réaction de trans-estérification permet à la liaison phosphoester préalablement rompue de se reformer (Figure 11C). Pour illustrer les réactions enzymatiques catalysées par les ADN topoisomérases, les substrats sont représentés sous forme de plectonèmes surenroulés négativement ou positivement ou pris dans un état relâché (Figure 12). La réaction la plus classique pour une ADN topoisomérase est la relaxation de l'ADN qu'il soit surenroulé négativement ou positivement (Figure 12). Certaines ont la capacité d'aller au-delà de l'état relâché en introduisant soit des supertours positifs soit des supertours négatifs. Il est possible pour une certaine catégorie d'ADN topoisomérases de moduler le niveau d'entrelacement entre deux duplexes d'ADN. Ces réactions de caténation / décaténation conduisent alors à une augmentation / diminution du niveau d'entrelacements inter-moléculaires (Figure 12).

2/ Les différentes familles de “magiciennes”

La distinction entre les ADN topoisomérases de type I et celles de type II se fait sur le nombre de brin(s) clivé(s) simultanément et donc suivant le nombre de liens topologiques modifié par cycle catalytique : les ADN topoisomérases de type I ne modifient l'ADN que d'un lien

| Type | Famille | Sous-famille | Caractéristiques | | Activités | | | | | Distribution | | |
|------|---------|----------------|------------------|-------------------|-----------|-----------|----------------|------|------|--------------|----------------|----------------|
| | | | Lien | Struct. | Rel. Sur+ | Rel. Sur- | Décat. | Sur+ | Sur- | Eucaryotes | Bactéries | Archées |
| I | IA | Topo I | 5' | α | - | +++ | + ¹ | - | - | - | + ² | + ² |
| | | Topo III | 5' | α | - | + | ++ | - | - | + | + | + |
| | | Reverse gyrase | 5' | α | - | +++ | ND | +++ | - | - | - | + ² |
| | IB | Topo IB | 3' | α | + | + | - | - | - | + | + ² | + ² |
| | IC | Topo V | 3' | α | + | + | - | - | - | - | - | + ² |
| II | IIA | Topo II | 5' | α_2 | + | + | + | - | - | + | - | - |
| | | Topo IV | 5' | $\alpha_2\beta_2$ | + | + | + | - | - | - | + | - |
| | IIB | ADN gyrase | 5' | $\alpha_2\beta_2$ | +++ | - | + | - | +++ | - | + | + ² |
| | | Topo VI | 5' | $\alpha_2\beta_2$ | ++ | ++ | ++ | - | - | VIA/Spo11 | - | + |

Figure 13- **Résumé des différentes propriétés des ADN topoisomérases.**

Les ADN topoisomérases de ce tableau sont classées selon leur type, leur famille et leur sous-famille. Les caractéristiques : **Lien** pour liaison covalente en 5' ou en 3'. **Struct.** : présente sous forme de monomères (α), d'homodimères (α_2) ou d'hétérotétramères ($\alpha_2\beta_2$). Les activités : **Rel. Sur+** : Relaxation des ADN surenroulés positivement, **Rel. Sur-** : Relaxation des ADN surenroulés négativement, **Décat.** : Décaténation (précision : +¹ pour décaténation d'hémicaténanes), **Sur+** : Introduction de supertours positifs, **Sur-** : Introduction de supertours négatifs, **+** : Réaction catalysée (précision : au plus il y a de +, au plus la réaction catalysée est efficace), **ND** : Non Documenté. La distribution : - : absente, + : présente, +² : présente dans certains organismes du domaine. Ce tableau ne prend pas en compte les ADN topoisomérases virales.

topologique par cycle catalytique alors que les ADN topoisomérases de type II le modifient de deux liens topologiques par cycle catalytique. Au sein de chacun des deux types, il est possible de distinguer des familles d'ADN topoisomérases présentant des spécificités mécanistiques mais aussi des spécificités d'activité (Champoux, 2001 ; Wang, 2002 ; Chen *et al.*, 2012) (Figure 13). Lors de la première étape de la réaction de trans-estérification, l'orientation de la liaison covalente entre l'enzyme et le groupement phosphate du brin clivé permet de distinguer, au sein des ADN topoisomérases de type I, la famille des IA qui sont liées à l'extrémité 5' phosphate du brin clivé ainsi que celle des IB qui sont liées à l'extrémité 3' phosphate du brin clivé. Si les deux familles de type I relâchent les supertours négatifs, seules les ADN topoisomérases IB sont également capables de relâcher les supertours positifs en contrôlant la rotation des brins (Figures 12 et 13). D'autres propriétés biochimiques telles que la dépendance au magnésium pour la relaxation et/ou la nécessité d'un substrat présentant une région simple brin participent à cette dichotomie IA-IB (Wang, 1996 ; Champoux, 2001).

Les ADN topoisomérases IA diffèrent également des ADN topoisomérases IB vis-à-vis de leur distribution dans le monde vivant. En effet, les ADN topoisomérases IA sont retrouvées chez l'ensemble des êtres vivants à l'exception des Thaumarchées alors que les ADN topoisomérases IB sont présentes chez les eucaryotes, certaines bactéries ainsi que chez les Thaumarchées (Brochier-Armanet *et al.*, 2008b). Notons que les ADN topoisomérases de type I comptent une troisième famille, celle des IC, restreinte à l'ADN topoisomérase V retrouvée uniquement chez l'euryarchée *M. kandleri* (Taneja *et al.*, 2006 ; Forterre, 2006). Initialement l'ADN topoisomérase V fut décrite comme appartenant à la famille des ADN topoisomérases IB car elle en présente toutes les caractéristiques biochimiques (Slesarev *et al.*, 1994) mais, l'analyse de sa structure tridimensionnelle révéla des différences au niveau des sites actifs (Taneja *et al.*, 2006). Cette ADN topoisomérase est originale de part sa restriction phylogénétique mais aussi parce qu'elle montre, en plus de son activité ADN topoisomérase, une activité lyase l'impliquant alors dans la réparation de l'ADN (Belova *et al.*, 2001 ; Belova *et al.*, 2002 ; Rajan *et al.*, 2013).

Au sein même de la famille des ADN topoisomérases IA, cinq sous familles sont à dénombrer à travers les trois domaines du vivant : les ADN topoisomérases I bactériennes (gène *topA*) qui diffèrent des ADN topoisomérases III bactériennes (gène *topB*), des ADN topoisomérases III eucaryotes (gène *top3*) ainsi que des ADN topoisomérases III archéennes (gène *topA*) et enfin, la reverse gyrase (gène unique *topR* chez les *Euryarchaeota* hyperthermophiles et les bactéries (hyper)thermophiles ; deux gènes *topR1* et *topR2* chez la

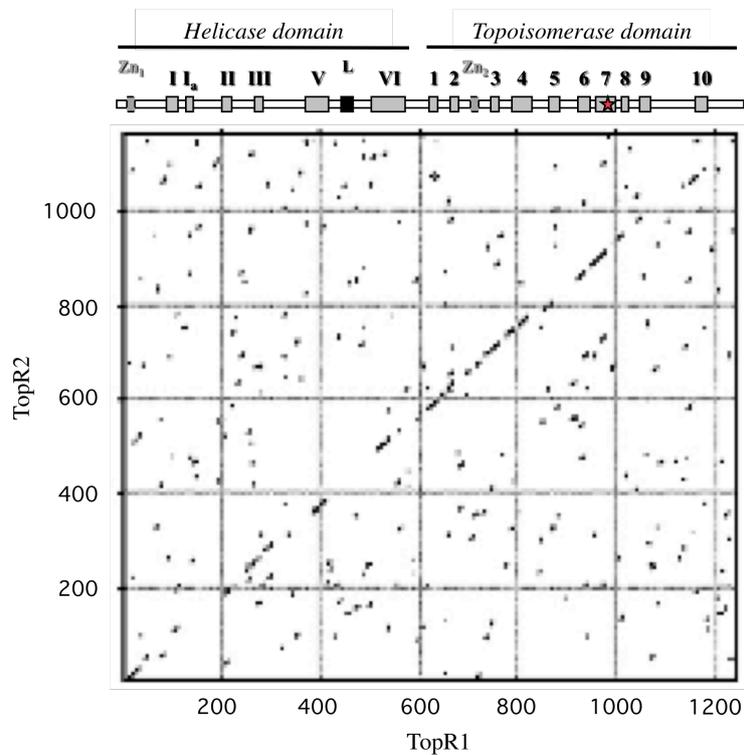


Figure 14- **Comparaison des séquences en acides aminés de TopR1 et de TopR2 de *Sulfolobus solfataricus*.**

Un schéma situé au-dessus du dot plot représente les différents motifs retrouvés dans TopR1. Les motifs conservés du domaine hélicase (I-VI) à l'extrémité amino-terminale et ceux du domaine ADN topoisomérase IA (1-10) à l'extrémité carboxy-terminale sont représentés par des rectangles gris. Les motifs annotés Zn₁-Zn₂ et L matérialisent respectivement les motifs de liaison du zinc et la région du latch de la reverse gyrase. L'étoile rouge symbolise la position de la tyrosine au sein du site actif. Figure issue de (Bizard *et al.*, 2011).

plupart des *Crenarchaeota*) (Duguet *et al.*, 2006). Cependant, sous cette apparente hétérogénéité de la famille des IA, leurs structures tridimensionnelles sont toutes similaires et elles possèdent toutes un domaine protéique commun, appelé *topofold* (Duguet *et al.*, 2006). Ce domaine protéique contient environ 150 acides aminés et sa structure adopte la forme typique d'un fer à cheval. Initialement observé dans la structure de l'ADN topoisomérase I de la bactérie *E. coli* tronquée de son domaine carboxylique, ce *topofold* a ensuite été retrouvé dans l'ADN topoisomérase I de la bactérie thermophile *Thermotoga maritima* protéolysée par la trypsine ainsi que dans la reverse gyrase de l'euryarchée *Archaeoglobus fulgidus*. Bien que les séquences protéiques montrent une faible similarité, les structures secondaire et tridimensionnelle sont conservées dans toutes les ADN topoisomérases de la famille IA (Duguet *et al.*, 2006). Contrairement aux autres ADN topoisomérases IA, la reverse gyrase (TopR ou TopR1-TopR2) possède en plus du domaine topoisomérase IA un domaine hélicase. Un alignement des séquences protéiques de TopR1 et de TopR2 rend compte de la fusion de ces deux domaines et montre que TopR1 et TopR2, en partageant 35% d'identité, sont des protéines proches (Figure 14). Cette ADN topoisomérase IA est capable, en plus de relâcher de l'ADN surenroulé négativement, d'introduire des supertours positifs (Kikuchi et Asai, 1984) (Figures 12 et 13). Le cas de la reverse gyrase sera développé plus en détails dans le chapitre IV de l'introduction de cette thèse.

En ce qui concerne les ADN topoisomérases de type II, deux familles sont à distinguer essentiellement sur des différences structurales: les topoisomérases IIA et IIB. En effet, les topoisomérases IIA et IIB partagent les mêmes domaines catalytiques mais leur architecture globale respective est différente (Berger et Wang, 1996 ; Chen *et al.*, 2012). Par ailleurs, du point de vue de leur distribution dans les trois domaines du vivant, les ADN topoisomérases IIA regroupent les ADN topoisomérases de type II eucaryotes (*topoII α* et *topoII β*) et bactériennes (Topo IV (*parE-parC*) et ADN gyrase (*gyrA-gyrB*)) et les ADN topoisomérases IIB sont représentées par l'ADN topoisomérase VI d'archée (Bergerat *et al.*, 1994 ; Bergerat *et al.*, 1997). A l'exception de l'ADN gyrase, les ADN topoisomérases de type II relâchent les supertours négatifs et positifs et sont aussi capables de décaténer / caténer (Figures 12 et 13). Enfin, l'ADN gyrase est la seule capable d'introduire des supertours négatifs (Figures 12 et 13).

Les cellules possèdent donc un large choix d'ADN topoisomérases et c'est essentiellement à la lumière de leurs activités *in vitro* que sont proposées leur(s) implication(s) *in vivo*.

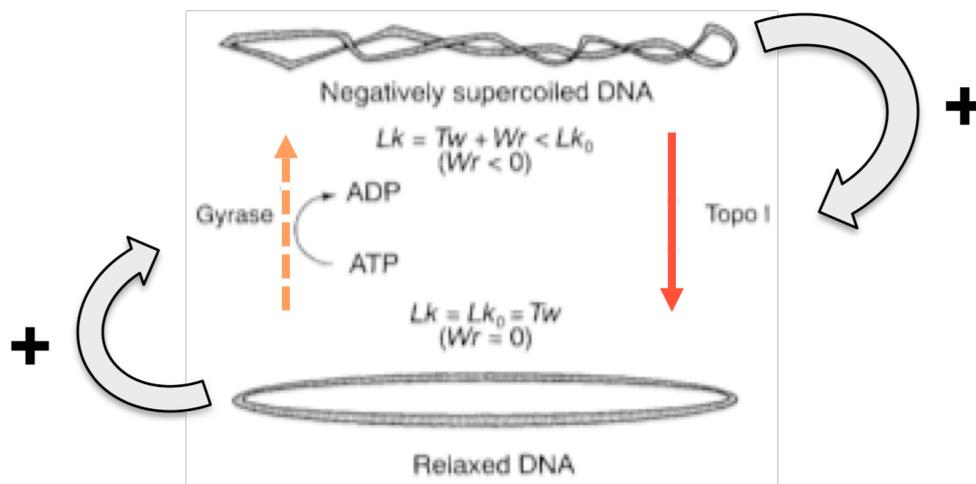


Figure 15- **Illustration de la régulation du surenroulement de l'ADN chez *Escherichia coli*** (issue de (Tse-Dinh *et al.*, 1997)).

Cette régulation est médiée par l'ADN gyrase qui introduit des supertours négatifs (flèche orange en pointillé) et la topoisomérase I qui relâche l'ADN surenroulé négativement (flèche rouge). Le niveau de surenroulement module l'expression des gènes codant ces deux ADN topoisomérases aux activités antagonistes. Les flèches grises symbolisent l'augmentation d'expression de l'ADN gyrase et de la topoisomérase I.

B- D'un point de vue fonctionnel

1/ Régulation homéostatique du surenroulement

Les processus informationnels tels que la réplication et la transcription ont un impact dynamique et local sur le niveau de surenroulement et les ADN topoisomérases, de par leurs activités respectives, sont impliquées dans la résolution des contraintes topologiques générées, entre autres, lors de ces processus. Ainsi, les ADN topoisomérases contrôlent et maintiennent un degré de surenroulement de l'ADN compatible avec la vie cellulaire et sont, pour certaines d'entre elles, fortement régulées en retour par le surenroulement de l'ADN.

Cette autorégulation a clairement été démontrée pour l'ADN topoisomérase I et l'ADN gyrase dans le cadre de la régulation homéostatique du surenroulement chez *E. coli* (Figure 15). En effet, cette régulation fut mise en évidence il y a plus de 20 ans lors de la caractérisation des mutants de ces deux ADN topoisomérases (Menzel et Gellert, 1983 ; Tse-Dinh, 1985). Depuis, plusieurs études ont montré que l'absence de ces deux ADN topoisomérases a un impact sur la topologie de l'ADN. Les mutations du gène *topA* entraînent une accumulation de supertours négatifs (Pruss *et al.*, 1986 ; Wu *et al.*, 1988) alors qu'une inhibition de l'ADN gyrase aboutit à un ADN surenroulé positivement (Lockshon et Morris, 1983). De plus, l'ADN bactérien est surenroulé négativement dans une souche sauvage alors que celui des mutants thermosensibles de *gyrA* ou de *gyrB* en condition non permissive se retrouve dans un état relâché suggérant alors un rôle *in vivo* de l'ADN gyrase dans le contrôle du surenroulement de l'ADN (Steck et Drlica, 1984). D'un point de vue fonctionnel, la régulation du niveau de surenroulement s'effectue par une balance entre l'activité de surenroulement de l'ADN gyrase et l'activité de relaxation de l'ADN topoisomérase. En effet, la délétion du gène *topA* chez *E. coli* provoque une augmentation de surenroulement négatif et ces délétions sont tolérées uniquement en présence de mutations compensatrices qui réduisent le niveau de surenroulement (Pruss *et al.*, 1982 ; DiNardo *et al.*, 1982 ; Raji *et al.*, 1985). La boucle directe de régulation fait intervenir à la fois les activités antagonistes de l'ADN topoisomérase I et l'ADN gyrase et une régulation transcriptionnelle opposée de ces deux gènes spécifiant ces ADN topoisomérases. Cela aboutit à une densité intermédiaire de surenroulement du chromosome bactérien (Menzel et Gellert, 1983 ; Tse-Dinh, 1985 ; Drlica, 1992).

Chez les eucaryotes, très peu de données existent concernant l'implication des ADN topoisomérases dans la régulation homéostatique du surenroulement de l'ADN. Néanmoins,

chez la levure, il a été montré que l'organisation du chromosome sous forme de chromatine est liée aux ADN topoisomérases de type I et de type II. En effet, l'activité de l'ADN topoisomérase de type I est nécessaire pour relâcher la chromatine au niveau des régions promotrices et ainsi, permettre l'expression des gènes ciblés (Durand-Dubief *et al.*, 2010).

Par contre chez les archées, rien n'est établi à l'heure actuelle bien que les archées hyperthermophiles possèdent des activités antagonistes par le biais de la reverse gyrase et de l'ADN topoisomérase VI.

2/ La résolution des contraintes créées lors de la réplication

a - Relaxation des supertours positifs générés en aval de la fourche

Chez les bactéries, deux ADN topoisomérases de type II sont présentes : la topoisomérase IV et l'ADN gyrase. L'activité de surenroulement négatif catalysée *in vitro* par l'ADN gyrase (Gellert *et al.*, 1976) a été mise en évidence *in vivo* grâce à la construction de mutants thermosensibles. En effet, alors que l'ADN bactérien est surenroulé négativement, celui des mutants thermosensibles de l'un des deux gènes *gyrA* ou *gyrB*, se retrouve dans un état relâché à température non permissive suggérant ainsi un rôle de l'ADN gyrase dans le contrôle du surenroulement de l'ADN (Steck et Drlica, 1984).

Hiasa et Mariani développèrent en 1994 un système de réplication *in vitro* afin de comparer les activités des différentes ADN topoisomérases de la bactérie *E. coli* sur les contraintes topologiques générées au cours de la réplication. Ainsi, il a été montré qu'en introduisant des supertours négatifs, l'ADN gyrase réduisait le nombre de liens topologiques de la molécule d'ADN et empêchait par conséquent l'accumulation des supertours positifs générés en aval des machineries lors de l'initiation et de l'élongation (Hiasa *et al.*, 1994 ; Hiasa et Mariani, 1996).

L'ADN gyrase ainsi que la topoisomérase IV peuvent être inhibées par des antibiotiques de la famille des quinolones mais elles ne présentent pas la même sensibilité. L'ADN gyrase étant plus sensible que la topoisomérase IV, son inhibition nécessite donc une concentration plus faible de quinolones (Khodursky *et al.*, 1995). Cette caractéristique est très utile car elle permet de cibler l'une ou les deux topoisomérases et ce éventuellement en conjonction avec les protéines mutantes. L'inhibition de l'ADN gyrase en présence d'une faible concentration de quinolones dans une souche *gyrA^{ts}* provoque le ralentissement de l'avancée de la fourche de réplication que la température soit permissive ou non permissive (Khodursky *et al.*, 2000). En revanche, l'élongation de la réplication d'une souche *gyrB^{ts,r}*

cultivée à température non permissive est fortement ralentie suite à l'inhibition de la topoisomérase IV par une concentration de quinolones élevée plus importante (Khodursky *et al.*, 2000). De plus, l'inhibition de la topoisomérase IV par mutation thermosensible *parE^{ts}* dans un contexte où la gyrase est non fonctionnelle amplifie l'accumulation d'ADN surenroulé positivement en aval des machineries, et donc *a fortiori* le ralentissement de la fourche de réplication (Khodursky *et al.*, 2000). Ce résultat indique que la topoisomérase IV participe, en plus de l'ADN gyrase, à l'élimination des contraintes topologiques liées à la réplication (Khodursky *et al.*, 2000). Etant donné que l'activité de relaxation de l'ADN topoisomérase IV est plus efficace sur des substrats contenant des supertours positifs que sur des substrats surenroulés négativement, cela renforce son implication *in vivo* dans la résolution des supertours positifs générés en aval de la fourche de réplication (Crisona *et al.*, 2000).

Chez les eucaryotes, deux enzymes sont capables de prendre en charge les supertours positifs : les ADN topoisomérases IIA ainsi que les ADN topoisomérases IB. Plusieurs analyses génétiques montrent un rôle des ADN topoisomérases IB au cours de l'initiation et de l'élongation de la réplication. En effet, les simples mutants des ADN topoisomérases I et II de la levure effectuent leur réplication de la même manière que les souches sauvages. Cela suggère que dans la prise en charge des contraintes topologiques créées lors de l'élongation de la réplication les ADN topoisomérases I peuvent se substituer aux ADN topoisomérases II (Brill *et al.*, 1987). Le double mutant thermosensible pour les deux types d'ADN topoisomérases de levure montre que la présence de l'une ou de l'autre est nécessaire pour la réplication (Brill *et al.*, 1987). D'autres mutants des ADN topoisomérases I et II indiquent que l'initiation de la réplication peut s'effectuer sans ces deux types d'ADN topoisomérases mais que cette absence a un impact sur l'élongation (Kim et Wang, 1989). Finalement, il apparaît que les ADN topoisomérases I interviennent de concert avec l'ADN topoisomérase de type II dans l'élongation en relâchant les supertours positifs en aval de la fourche de réplication (Kim et Wang, 1989 ; Bermejo *et al.*, 2007).

L'enzyme responsable de l'élimination *in vivo* des supertours positifs chez les archées thermophiles n'est pas clairement établie à l'heure actuelle. Cependant, il est probable que, chez les Sulfolobales, ce substrat soit pris en charge par la topoisomérase VI, l'unique enzyme capable de relâcher l'ADN surenroulé positivement (Bergerat *et al.*, 1994).

b - Prise en charge des précaténanes/caténanes en amont de la fourche

Au cours de l'élongation de la fourche de réplication, vraisemblablement, des précaténanes se forment conduisant à la création de caténanes au moment de la ségrégation des chromosomes. Le passage d'un duplexe d'ADN au travers d'un autre est réalisé par les ADN topoisomérases de type II et constitue une partie clé dans la résolution de ces types de contraintes topologiques.

Chez les bactéries, l'inhibition de l'ADN topoisomérase IV conduit à la mise en évidence *in vivo* de ces précaténanes (Adams *et al.*, 1992). De plus, la comparaison de l'activité de décaténation des deux ADN topoisomérases de type II bactériennes indique que c'est l'ADN topoisomérase IV qui assure préférentiellement la décaténation (Peng et Mariani, 1993 ; Hiasa *et al.*, 1994). Bien que la survie partielle des mutants de la topoisomérase IV soit obtenue en surexprimant *gyrA* et *gyrB*, ce résultat montre que l'activité de décaténation portée par l'ADN gyrase est nettement inférieure à celle de la topoisomérase IV (Kato *et al.*, 1992). En effet, il a aussi été montré que l'ADN gyrase est 100 fois moins efficace que la topoisomérase IV dans la décaténation de plasmides *in vitro* (Zechiedrich et Cozzarelli, 1995). Par ailleurs, l'interaction physique entre l'ADN topoisomérase IV et le moteur protéique FtsK, connu pour être responsable de la ségrégation des chromosomes, indique que cette ADN topoisomérase serait impliquée dans la résolution des caténanes, d'autant que son activité est stimulée par ce même facteur protéique (Espeli *et al.*, 2003 ; Bigot et Mariani, 2010). En plus des ADN topoisomérases de type II, il s'avère que les ADN topoisomérases de type I et plus précisément les ADN topoisomérases III interviennent dans la décaténation. En effet, la topoisomérase III bactérienne (*topB*), bien que classée parmi la famille des ADN topoisomérases de type I, a été caractérisée sur la base de l'activité de décaténation et fut donc distinguée de l'ADN topoisomérase I (*topA*) (DiGate et Mariani, 1988). Néanmoins et contrairement aux ADN topoisomérases de type II, cette activité de décaténation *in vitro* n'est possible que si et seulement si une région simple brin est présente (DiGate et Mariani, 1988 ; Hiasa, 1994 ; Seol *et al.*, 2013). Au vue de cette configuration, il a alors été proposé que les ADN topoisomérases III interviennent dans la résolution des contraintes générées au niveau des fragments d'Okasaki (Nurse *et al.*, 2003).

Au sein des eucaryotes, une seule famille d'ADN topoisomérase de type II est présente contre deux familles d'ADN topoisomérase de type I. Afin de savoir quel type d'ADN topoisomérase intervient lors de la réplication des chromosomes, une étude menée sur des cellules de foie en régénération a comparé les activités des ADN topoisomérases de type I

et de type II (Duguet *et al.*, 1983). Alors que les activités de relaxation des ADN topoisomérases de type I restent inchangées au cours de la régénération hépatique, l'activité de décaténaion des ADN topoisomérases de type II se retrouvent augmentées suggérant ainsi un rôle des ADN topoisomérases de type II dans la division cellulaire (Duguet *et al.*, 1983). Par ailleurs chez la levure, la caractérisation du mutant thermosensible de l'ADN topoisomérase de type II montre d'une part que des caténanes sont formés *in vivo* à l'issue de la réplication et d'autre part l'implication de ces ADN topoisomérases dans la ségrégation du chromosome (DiNardo *et al.*, 1984). Heck et Earnshaw ont montré, par utilisation d'anticorps reconnaissant les ADN topoisomérases de type II eucaryotes, une variation de leur présence suivant que les cellules prolifèrent ou non (Heck et Earnshaw, 1986). Lorsqu'une cellule cesse de proliférer, sans pour autant que son activité de transcription soit abolie, le niveau des ADN topoisomérases de type II diminue. Inversement, la reprise de la prolifération cellulaire s'accompagne de l'augmentation de la quantité d'ADN topoisomérases II. Ainsi, cette étude présente les ADN topoisomérases de type II comme des marqueurs de la prolifération cellulaire. Une étude récente menée chez la levure souligne l'intervention des ADN topoisomérases III dans la ségrégation des chromosomes. En effet, il a été montré que cette ADN topoisomérase est localisée en particulier au niveau des centromères et interagit avec une protéine de type histone connue pour être un composant essentiel à la ségrégation des chromosomes (Norman-Axelsson *et al.*, 2013).

Dans le domaine des archées, et plus précisément chez le *crenarchaeon S. shibatae*, la purification en 1994 de l'ADN topoisomérase VI (ADN topoisomérase de type II) a permis de montrer que cette enzyme ne présente aucune activité de surenroulement, qu'elle relâche aussi bien les ADN surenroulés positivement que négativement et qu'elle est capable de décaténer (Bergerat *et al.*, 1994). La sous-unité A de cette ADN topoisomérase VI est homologue à la protéine Spo11 de levure connue pour être un facteur essentiel de la recombinaison méiotique (Bergerat *et al.*, 1997 ; Nichols *et al.*, 1999). Bien qu'aucune évidence *in vivo* ne soit établie quant à la participation de la topoisomérase VI dans la ségrégation des chromosomes d'archées, cette hypothèse est tout de même fortement probable. Comme chez les bactéries et les eucaryotes, l'ADN topoisomérase III d'archée semble participer indirectement à la ségrégation des chromosomes. En effet, lorsque le gène codant l'ADN topoisomérase III est délété au sein du *crenarchaeon* hyperthermophile *Sulfolobus islandicus*, il y a une augmentation des cellules possédant plus de 2 chromosomes lorsque les cellules se divisent plus ou moins activement (Li *et al.*, 2011).

c - Résolution des jonctions à quatre branches

Au cours de la réplication, il est possible qu'après un arrêt il y ait dissociation du réplisome, ce qui peut engendrer une réversion de fourches. Il s'agit du réappariement des brins parentaux permettant alors l'appariement des brins fils. La structure représente une jonction à quatre branches qui est une structure thermodynamiquement stable et relâchée (Viguera *et al.*, 2000 ; Michel, 2000). Les jonctions de Holliday, formées au cours de la recombinaison homologue entre deux duplexes d'ADN, ont des structures proches avec les jonctions à quatre branches. Les hélicases de la super famille de type 2 interviennent dans les processus de recombinaison et sont connues pour être impliquées dans la stabilité des génomes (Vindigni et Hickson, 2009). L'inactivation de plusieurs homologues humains tels que BLM, WRN et RECQ4 a pour conséquence un phénotype d'hyper-recombinaison et de réarrangements génomiques (Hickson, 2003 ; Wu et Hickson, 2006 ; Wu, 2007). Si ces hélicases interviennent dans la stabilité des génomes, c'est souvent en association avec les ADN topoisomérases III. Ces dernières furent d'ailleurs distinguées des ADN topoisomérases I par cette activité de recombinaison (Wallis *et al.*, 1989). L'association protéique hélicase-ADN topoisomérase III fut mise en évidence pour la première fois par la découverte du gène *sgs1* en tant que supresseur du phénotype de ralentissement de croissance de la levure ainsi que celui d'hyper-recombinaison induit par la mutation du gène *top3* (Gangloff *et al.*, 1994). L'association entre Sgs1 et l'ADN topoisomérase III rappelle les deux domaines qui composent la reverse gyrase (Confalonieri *et al.*, 1993). D'ailleurs, il a été récemment montré que la reverse gyrase pouvait être impliquée *in vitro* dans la résolution des jonctions à quatre branches (Valenti *et al.*, 2010). L'étude de l'activité de clivage d'oligonucléotides de l'ADN topoisomérase III de *S. solfataricus* suggère qu'elle pourrait être impliquée dans la recombinaison (Chen et Huang, 2006). Pour renforcer cette idée, il a également été montré *in vitro* une interaction entre la topoisomérase III de *S. solfataricus* et une hélicase de type RecQ. De par ces activités, ce complexe pourrait intervenir dans la recombinaison (Valenti *et al.*, 2012).

Chez les bactéries, une interaction entre l'ADN topoisomérase III et l'hélicase RecQ fut mise en évidence pour la première fois lors du processus de recombinaison (Harmon *et al.*, 1999). De plus, un rôle de l'ADN topoisomérase III bactérienne dans la résolution des contraintes topologiques issues de la recombinaison reste proposé. En effet, l'approche par molécules uniques révèle des caractéristiques de la topoisomérase III bactérienne cohérentes avec un possible rôle dans la résolution de substrats spécialisés transitoires dans les cellules

comme les intermédiaires à quatre branches de réplication. En effet, la topoisomérase III relâche l'ADN par des cycles catalytiques processifs mais précédés et entrecoupés par de longues pauses (Terekhova *et al.*, 2012 ; Terekhova *et al.*, 2013). Ces caractéristiques mécanistiques sont en accord avec une potentielle implication dans la recombinaison ou la terminaison de la réplication.

3/ Résolution des contraintes topologiques créées au cours de la transcription

a - Relaxation des supertours positifs et négatifs

De la même manière que des supertours positifs sont créés lors de la réplication, des supertours positifs sont générés à l'avant des machineries de transcription (Liu et Wang, 1987 ; Wu *et al.*, 1988). Dans les systèmes bactérien et eucaryote, ils sont éliminés par les ADN topoisomérases de type II ainsi que par les ADN topoisomérases IB chez les eucaryotes (Zechiedrich *et al.*, 2000 ; Mondal *et al.*, 2003). Chez les archées, le rôle de l'ADN topoisomérase VI dans la transcription n'est pas clairement établi mais puisqu'elle constitue l'unique ADN topoisomérase capable de relâcher ce type de contraintes topologiques chez ces organismes, son implication est fortement suggérée (Bergerat *et al.*, 1994). Pour ce qui est de la relaxation des supertours négatifs, les ADN topoisomérases de type I (IA comme IB) sont sollicitées (Massé et Drolet, 1999). Leur interaction directe avec l'ARN polymérase faciliterait leur recrutement directement au niveau de la machinerie de transcription et pourrait relâcher les supertours négatifs générés (Cheng *et al.*, 2003). Chez les eucaryotes, la synthèse d'ARN est dépendante de l'activité de l'ADN topoisomérase II α et il a été montré que cette enzyme est également associée à l'ARN polymérase II (Mondal et Parvin, 2001). La délétion du gène codant l'ADN topoisomérase III chez le *crenarchaeon S. islandicus* entraîne une augmentation de la transcription de certains gènes notamment celui qui code la protéine Sul7d (Li *et al.*, 2011). Il semble alors possible que l'ADN topoisomérase III d'archée soit impliquée dans la prise en charge des supertours négatifs formés au cours de la transcription pour réguler l'expression de certains gènes (Li *et al.*, 2011).

b - Régulation de l'expression des gènes

Les conditions environnementales, et plus précisément les variations environnementales, ont une influence sur l'expression de groupes de gènes impliqués dans l'adaptation aux conditions environnementales. Dans les années 2000, il a été montré à l'échelle génomique chez la levure que les profils d'expression de gènes intervenant dans l'adaptation sont dépendants des conditions environnementales. En effet, suite à divers stress environnementaux, des variations distinctes dans l'expression de gènes répondant à chaque stress ont été observées (Gasch *et al.*, 2000).

En fait, il est admis, depuis le milieu des années 80, qu'un *stimulus* environnemental spécifique altère le surenroulement de l'ADN *in vivo* et contribue par conséquent à la régulation de la transcription d'un certain nombre de gènes. Cette association directe entre les variations des paramètres de croissance, de surenroulement de l'ADN et d'expression de certains groupes de gènes est souvent retrouvée dans le processus d'adaptation bactérienne (Dorman *et al.*, 1988 ; Tse-Dinh *et al.*, 1997). En effet, il a été montré plusieurs fois que le degré de surenroulement bactérien varie en fonction des conditions de croissance telles que la température, les phases de croissance ou la quantité de dioxygène (Goldstein et Drlica, 1984 ; Balke et Gralla, 1987 ; Dorman *et al.*, 1988 ; Higgins *et al.*, 1988).

La régulation homéostatique du surenroulement de l'ADN mise en évidence chez la bactérie *E. coli* montre d'une part l'importance pour une cellule de maintenir un niveau de surenroulement adapté à une condition de croissance donnée et d'autre part, démontre que l'expression des régulateurs est directement contrôlée par le niveau de surenroulement (Menzel et Gellert, 1983 ; Tse-Dinh, 1985). Deux études globales montrent également que les variations de topologie modifient directement l'expression de certains gènes. Ainsi, les gènes codant les enzymes impliquées dans le cycle des acides tricarboxyliques ou la voie de biosynthèse des purines, répondent différemment aux changements topologiques (Blot *et al.*, 2006). Chez la levure, il est montré que plus l'ADN est surenroulé positivement et plus le pourcentage de gènes dont la transcription est altérée augmente (Joshi *et al.*, 2010). D'après une étude portant sur les variations des profils d'expression des gènes bactériens, l'expression d'environ 7% des gènes serait directement dépendante du niveau de surenroulement (Peter *et al.*, 2004). Ce lien entre la variation du surenroulement et l'expression des gènes peut s'expliquer par le fait que l'expression de ces gènes soit sous le contrôle de promoteurs sensibles au surenroulement. En effet, si le surenroulement a un effet sur la transcription, cet effet est promoteur dépendant et répond aux variations du surenroulement (Lim *et al.*, 2003).

Ces variations du degré de surenroulement peuvent faciliter ou limiter d'une part, l'ouverture de la double hélice au niveau des régions promotrices et d'autre part, la formation du complexe de pré-initiation comme cela a été montré *in vitro* chez les bactéries, les eucaryotes et les archées (Mizutani *et al.*, 1991 ; Kusano *et al.*, 1996 ; Bell *et al.*, 1998).

IV - Thermophilie et Reverse gyrase

A- Instabilité génomique

1/ Impact de la température sur la topologie de l'ADN

Les variations de températures altèrent la géométrie de la double hélice en changeant le pas (Depew et Wang, 1975 ; Duguet, 1993). Les variations du pas se répercutent directement sur le niveau d'enroulement des deux brins (T_w) par la relation de dépendance ($T_w = N/h$). Dans une molécule d'ADN double brin circulaire covalentement fermée, en absence d'ADN topoisomérase, la variation du nombre de liens topologiques est nulle ($\Delta Lk = 0$). Comme nous l'avons vu dans le chapitre II de l'introduction, puisque le nombre de liens topologiques est un invariant, toute variation dans la valeur d'enroulement T_w induit une variation opposée de la valeur de surenroulement W_r . Illustrons notre propos et considérons une molécule d'ADN circulaire covalentement fermée prise dans un état relâché ($W_r \approx 0$) à 25°C et ayant un nombre de paire de bases (pb) égal à 998. Dans ces conditions, le pas de la double hélice $h_{25^\circ\text{C}}$ est de 10,4 pb/tour ($360^\circ/34,6^\circ$ par pb qui correspond à l'angle de rotation de l'hélice).

Nous pouvons déterminer les paramètres topologiques à 25°C :

$$T_{w_{25^\circ\text{C}}} \approx +96$$

$$W_{r_{25^\circ\text{C}}} \approx 0 \quad (\text{Molécule « relâchée »})$$

$$L_{k_{25^\circ\text{C}}} = +96$$

Lors d'une augmentation de la température de 1°C, l'angle de rotation de l'hélice diminue à raison de 0,0105°/pb (Duguet, 1993). De ce fait, si la température passe de 25°C à 80°C, soit une augmentation de 55°C, l'angle de rotation de l'hélice sera réduit de 0,578° par paire de base (55°C x 0,0105°/pb). A 80°C, le pas de la double hélice n'est donc plus égal à 10,4 pb/tour mais est environ égal à 10,6 pb/tour ($h_{80^\circ\text{C}} = 360/(34,6-0,578)$).

Nous pouvons calculer les paramètres topologiques à 80°C :

$$T_{w_{80^\circ\text{C}}} \approx +94$$

$$W_{r_{80^\circ\text{C}}} \approx +2 \quad (\text{Molécule surenroulée positivement})$$

$$L_{k_{80^\circ\text{C}}} = +96$$

De par cet exemple, nous voyons que l'augmentation de température induit une augmentation du pas de la double hélice. Cette variation du pas constitue une réponse mécanique de l'ADN vis-à-vis de la température qui se répercute de façon importante sur le surenroulement même

pour un ADN de petite taille. L'augmentation de la température apporte de l'énergie qui est alors stockée dans l'ADN sous forme de supertours positifs puisque la molécule d'ADN passe d'un état relâché à surenroulé positivement.

Toujours d'après cet exemple, il est important de noter que si le nombre de liens topologiques est invariant c'est parce que les extrémités de la molécule d'ADN considérée ne sont pas libres de rotation et qu'aucune coupure transitoire n'est introduite. Cependant, plusieurs études ont montré que le nombre de liens topologiques varie suite à des variations de températures (Goldstein et Drlica, 1984 ; Wang et Syvanen, 1992 ; López-García et Forterre, 1997). Ainsi, il a été suggéré que si le niveau de surenroulement est contrôlé c'est pour permettre un bon déroulement des activités cellulaires (Goldstein et Drlica, 1984). Dans le système bactérien, ce contrôle est pris en charge par les activités antagonistes de l'ADN topoisomérase I et de l'ADN gyrase et l'expression de ces deux protéines est régulée par le niveau de surenroulement (Menzel et Gellert, 1983 ; Tse-Dinh, 1985).

Suite à des variations de températures, il a été montré que les variations topologiques de plasmides d'archées se font en deux temps (López-García et Forterre, 1997). Dans un premier temps l'augmentation de la température induit une augmentation rapide du nombre de liens topologiques dans les plasmides, suivie par une diminution progressive de ce surenroulement pour atteindre un niveau topologique adapté à la nouvelle température (López-García et Forterre, 1997). Si l'implication des ADN topoisomérases, et notamment la reverse gyrase, dans cette régulation de la topologie chez les archées fut d'abord discutée (López-García et Forterre, 1999), les expériences réalisées au sein de l'équipe sur l'expression de *topR1* et *topR2* ont relancé cette hypothèse (Garnier et Nadal, 2008). Cette question fait d'ailleurs l'objet de l'étude présentée dans le chapitre II des résultats de cette thèse.

2/ Sensibilité de l'ADN vis-à-vis des hautes températures

Dès la découverte d'organismes capables de croître dans des biotopes dont les températures avoisinent les 70°C puis les 100°C, la question de la température limite de la vie a été posée. En effet, il ne peut y avoir de vie sans que les macromolécules (lipides, glucides, protéines et acides nucléiques) soient sous forme structurée. Or, si des organismes se développent à haute température, cela suppose que leurs macromolécules présentent une structure en adéquation avec de telles températures, ce qui n'avait pas été observé jusqu'alors.

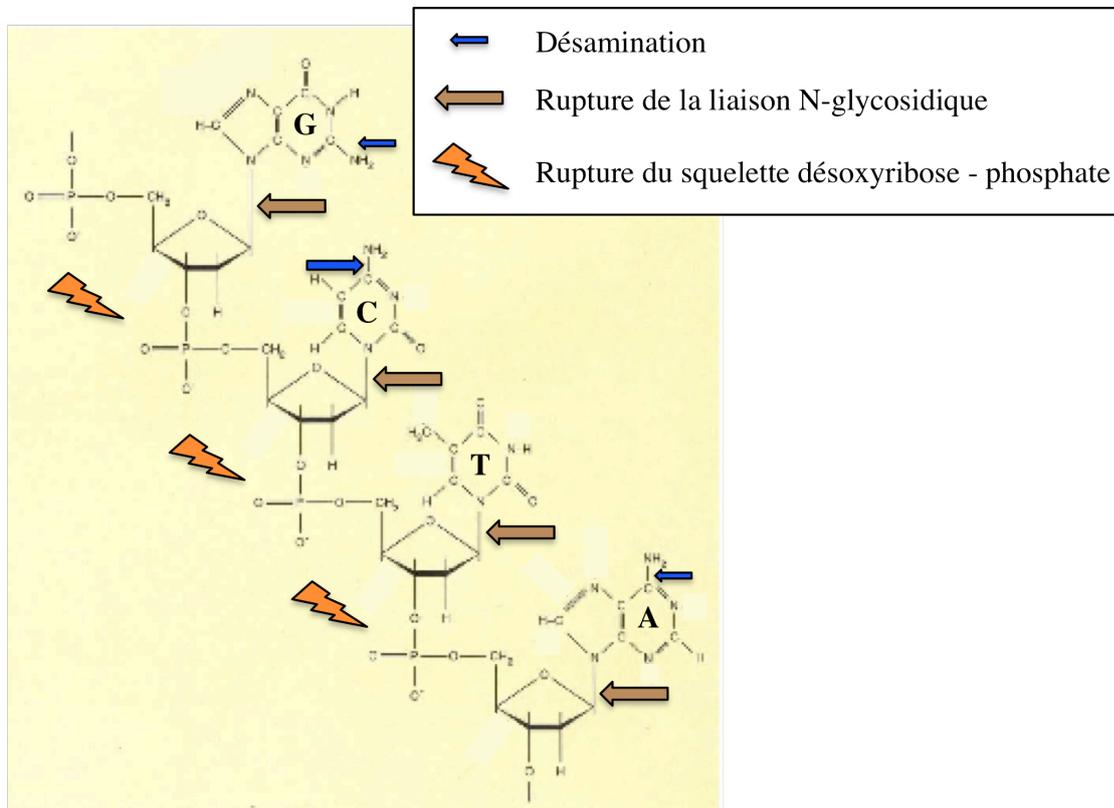


Figure 16- Présentation de trois composants de l'ADN pouvant subir des dommages augmentés par la température.

Un segment d'un ADN simple brin (schéma issu de la revue de Lindhal de 1993) présente les quatre bases azotées (**G**uanine, **C**ytosine, **T**hymine et **A**dénine) reliées par des liaisons N-glycosidiques au squelette désoxyribose phosphate. Les trois cibles visées par les hautes températures sont : les groupements amines des guanines, cytosines et des adénines (flèche bleue) ; la liaison N-glycosidique (flèche marron) et le squelette désoxyribose phosphate (éclair orange). La cytosine étant plus ciblée par les déaminations, la flèche correspondante est donc plus grande.

Mais attention, que les macromolécules soient thermostables ne signifie pas qu'elles ne subissent pas de dommages. L'ADN et l'ARN (Acide RiboNucléique) présentent des groupements réactifs notamment le groupement hydroxyle au niveau du carbone 2' du ribose, absent de l'ADN. La forte réactivité de ce groupement explique en partie la différence de stabilité et de réactivité de ces deux acides nucléiques. Néanmoins, l'ADN et l'ARN subissent, en particulier en solution aqueuse, des dommages spontanés, ces derniers étant augmentés par l'augmentation de la température (Lindahl, 1993) (Figure 16). Ainsi, la thermodégradation des acides nucléiques passe en particulier par la désamination spontanée des bases azotées (Lindahl, 1993). La fréquence de désamination des cytosines est 40 fois plus élevée que celle des adénines (Karran et Lindahl, 1980). A 37°C, les réactions de désamination sont très lentes et les premières études des constantes de désamination des cytosines en uraciles ou des adénines en hypoxanthines ont été réalisées à 110°C (Lindahl et Nyberg, 1974 ; Karran et Lindahl, 1980). De la même façon, l'approche génétique menée chez *E. coli*, qui consiste à mesurer le taux de désamination spontanée de chaque résidu cytosine du gène *lacZ*, a montré qu'en comparant des ADN simple brin incubés à 37°C ou à 80°C, le taux de désamination augmente de 140 fois à 80°C (Frederico *et al.*, 1990). Pour ces études, les bases azotées sont présentes dans un simple brin et sont donc accessibles au solvant. *A contrario*, les bases azotées appariées dans le cœur hydrophobe de la double hélice sont protégées du contact avec le solvant et doivent être moins sujettes aux désaminations spontanées. Pour répondre à ce postulat, une estimation de la durée de vie d'un résidu cytosine sous son état non désaminé a été réalisée prenant en compte le fait que celui-ci soit retrouvé au sein d'un ADN double brin ou simple brin pour une température de 37°C et un pH de 7,4 (Frederico *et al.*, 1990). Comme attendu, le duplexe d'ADN apporte une meilleure protection contre la désamination qu'un ADN simple brin, les durées de vie individuelles estimées étant respectivement d'environ 30000 ans et 200 ans (Frederico *et al.*, 1990).

Par comparaison à l'ARN, si la liaison phosphodiester de l'ADN est stabilisée par l'absence du groupement hydroxyle au niveau du carbone 2' du sucre, la liaison N-glycosyl entre la base azotée et le sucre se retrouve déstabilisée facilitant potentiellement sa rupture (Lindahl, 1993). La formation de sites abasiques se fait à une fréquence faible de manière spontanée mais est augmentée par la température (Figure 16). La vitesse de clivage de la liaison N-glycosidique entre une cytosine et le désoxyribose au sein d'un ADN simple brin est estimé à $6.10^{-8} \text{.sec}^{-1}$ à une température de 95°C et un pH de 7,4 (Lindahl et Nyberg, 1974).

D'après le même raisonnement que pour la désamination, un duplexe d'ADN doit, en théorie, permettre une meilleure protection des bases azotées contre la formation de sites abasiques. Ainsi, la fréquence de dépurination d'un ADN simple brin par rapport à celle d'un ADN double brin est augmentée par un facteur 4 (Lindahl, 1993). Lors de l'arrivée des machineries de transcription ou de réplication sur l'ADN, celui-ci forme des bulles de dénaturation laissant potentiellement les bases de ces bulles accessibles au solvant (Ambjörnsson *et al.*, 2007). Il est probable qu'au moment de la formation des complexes ouverts, les bases soient hydrolysées.

Le squelette désoxyribose-phosphate est également endommagé par les hautes températures (Figure 16). En effet, il a été montré *in vitro* que les hautes températures augmentent la fréquence des cassures dans le squelette désoxyribose-phosphate, que celui-ci soit destabilisé ou non par la présence de sites abasiques (Peak *et al.*, 1995). Cependant, il est rapporté que lorsque les cellules sont portées à 100°C l'ADN de la bactérie mésophile *E. coli* subit 20 fois plus de cassures que celui de l'euryarchée hyperthermophile *P. furiosus* (Peak *et al.*, 1995). Leurs molécules d'ADN n'étant pas intrinsèquement différentes, cette étude ouvre sur la présence d'autres composants cellulaires impliqués dans la thermoprotection tels que des protéines par exemple, palliant à tous ces dommages spontanés qui sont augmentés à haute température.

Des estimations du taux de mutation par génome et par cycle de réplication obtenues chez la bactérie *E. coli* et la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont respectivement : 0,0025 et 0,0027 (Drake, 1991). Chez le *crenarchaeon* hyperthermophile *S. acidocaldarius* le taux de mutation par génome et par cycle de réplication est d'environ 0,002 (Drake *et al.*, 1998) ; (Grogan *et al.*, 2001). De manière surprenante, ces trois valeurs sont comparables alors que nous avons vu plus haut que les hautes températures augmentent la fréquence d'apparition des dommages dans l'ADN. Ce résultat démontre que les organismes hyperthermophiles n'ont pas un taux de mutation plus élevé que les organismes mésophiles. La mesure des taux de mutation spontanée des gènes *pyrE* et *pyrF* chez *S. acidocaldarius* indique une fréquence d'évènements mutationnels de $(2,8 \pm 0,7) \times 10^{-7}$ par cellule par cycle de division pour le gène *pyrE* et de $(1,5 \pm 0,6) \times 10^{-7}$ pour le gène *pyrF* (Jacobs et Grogan, 1997). A 75°C et pour ces gènes de biosynthèse de la souche sauvage, l'estimation maximale est en moyenne de $3,3 \times 10^{-7}$ évènements mutationnels observables par kilobase par division cellulaire. Cette valeur est comparable à celles mesurées pour des gènes de la bactérie mésophile *E. coli* qui sont de

| | Species | Optimal T | mol% G + C DNA |
|-----|---|-----------|----------------|
| | Archaea | | |
| 1 → | <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> | 80 | 37 |
| | <i>Archaeoglobus fulgidus</i> | 83 | 46 |
| | <i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> | 83 | 33 |
| | <i>Desulphurococcus mobilis</i> | 85 | 51 |
| | <i>Methanococcus jannaschii</i> | 85 | 31 |
| | <i>Thermococcus celer</i> | 87 | 57 |
| | <i>Thermoproteus tenax</i> | 88 | 56 |
| | <i>Acidianus infernus</i> | 90 | 31 |
| | <i>Pyrobaculum islandicum</i> | 100 | 46 |
| 2 → | <i>Pyrococcus furiosus</i> | 100 | 38 |
| | <i>Methanopyrus kandleri</i> | 100 | 60 |
| | <i>Pyrodicticum occultum</i> | 105 | 62 |
| | <i>Pyrolobus fumarii</i> | 106 | 53 |
| | Bacteria | | |
| 3 → | <i>Thermotoga maritima</i> | 80 | 46 |
| | <i>Aquifex pyrophilus</i> | 85 | 40 |
| 4 → | <i>Escherichia coli</i> K-12 | 37 | 51 |

Figure 17- Le pourcentage en G+C est-il élevé chez les organismes hyperthermophiles?

Table extraite de la micro revue (Grogan, 1998). Sont présentés ici différentes espèces d'hyperthermophiles appartenant aux domaines *Archaea* et *Bacteria* caractérisés par leur température optimale de croissance (Optimal T) et leur pourcentage en G+C (mol% G+C DNA). Trois exemples d'organismes hyperthermophiles, indiqués par une flèche rouge, montrent clairement qu'il n'y pas de corrélation entre le pourcentage en G+C dans leur génome et la température optimale de croissance. **1** : *S. acidocaldarius* est un *crenarchaeon* ; **2** : *P. furiosus* est un *euryarchaeon* et **3** : *A. Pyrophilus* est un *aquificaeon*. Ces trois micro-organismes ont une température de croissance optimale relativement élevée (entre 80°C et 100°C) et leur pourcentage en G+C de leur génome n'excède pas 40%. Pour la comparaison, les informations concernant la bactérie mésophile *E. coli* K12 sont ajoutées (**4** flèche bleue).

$1,6 \times 10^{-7}$ et $2,0 \times 10^{-7}$ évènements mutationnels observables par kilobase et par division cellulaire respectivement pour les gènes de l'opéron histidine et pour les gènes permettant l'utilisation de l'arabinose (Jacobs et Grogan, 1997). Ces résultats décrivent donc *S. acidocaldarius* comme un micro-organisme dont la stabilité génétique est comparable à celle de *E. coli* bien que ses conditions de vie soient plus délétères. Comme l'ADN des organismes hyperthermophiles ne montre pas intrinsèquement une meilleure stabilité vis-à-vis de la thermodégradation mais que la vie peut exister sous ces conditions, l'hypothèse la plus simple est de considérer la mise en place de mécanismes préservant à la fois la stabilité et le maintien de l'information génétique.

B- Maintien de l'information génétique à hautes températures

Un appariement entre une guanine et une cytosine fait intervenir trois liaisons hydrogènes par comparaison à un appariement entre une adénine et une thymine qui classiquement n'en fait intervenir que deux. L'appariement G:C est donc globalement considéré comme plus stable par rapport à un appariement A:T, surtout si les successions d'appariement poly A:poly T ne sont pas considérés dans la comparaison. Un ADN enrichi en appariement G:C serait donc un bon moyen pour palier la dénaturation de la double hélice (Marmur et Doty, 1962). Pourtant, l'analyse des génomes d'organismes hyperthermophiles ne donne aucun argument en faveur d'une corrélation entre un pourcentage en G:C élevé et la température de croissance de ces organismes, (Wang *et al.*, 2006 ; Henri et Oshima, 2007) (Figure 17). Quelles sont donc les stratégies mises en place chez les hyperthermophiles pour stabiliser d'une part et réparer d'autre part leur matériel génétique?

1/ Stabilisation de l'ADN

Des composants intracellulaires peuvent intervenir dans la stratégie de stabilisation de la double hélice (Charlier et Droogmans, 2005 ; Daniel et Cowan, 2000). L'ADN est un polymère très acide dont les charges négatives portées par les groupements phosphates sont dirigées vers l'extérieur. La répulsion de ces charges entraîne une instabilité de l'ADN qui peut être évitée par l'ajout de cations (Marmur et Doty, 1962). Cependant, cette stabilité apportée par les cations est différente suivant que le cation est monovalent ou bivalent. En effet, la thermoprotection est optimale avec une concentration de cations monovalents (K^+ ou Na^+) dix fois supérieure à celle de cations bivalents (Mg^{2+}). Outre la stabilité de l'appariement, la dégradation du squelette phosphodiester est également évitée en présence

d'ions (Marguet et Forterre, 1994). Bien que cette propriété soit vraie pour toutes les molécules d'ADN, il a été montré que plusieurs organismes hyperthermophiles ont des concentrations intracellulaires en sels très élevées ou en tous cas plus élevées que chez des organismes mésophiles.

De la même manière, il a été proposé que des polyamines, rencontrés dans la plupart des cellules, interviennent dans la stabilisation des acides nucléiques (Henri et Oshima, 2007). Des polyamines longs et linéaires sont retrouvés chez l'ensemble des êtres vivants mais les hyperthermophiles, *Bacteria* comme *Archaea*, se distinguent par la production d'une plus grande variété de polyamines, y compris de polyamines branchées. Chez les Sulfolobales, la composition en polyamines varie suivant la température de croissance, ce qui suggère un rôle important dans la maintenance des fonctions cellulaires à hautes températures (Friedman et Oshima, 1989). Il a d'ailleurs été montré *in vitro* que les deux types de polyamines (linéaires et branchés) limitent la dénaturation thermique de duplexes d'ADN, d'ADN simple brin structuré en épingle à cheveux et d'ARNt mais avec plus ou moins d'efficacité suivant le substrat considéré (Terui *et al.*, 2005). En effet, la température de fusion des ADN double brin est augmentée en présence de polyamines linéaires alors que les polyamines branchés offrent une meilleure stabilité aux ADN simple brin et ARNt (Terui *et al.*, 2005).

Les processus cellulaires tels que la réplication ou la transcription nécessitent la formation d'un complexe ouvert. Les températures apportant suffisamment d'énergie pour rompre, *a priori*, spontanément les liaisons hydrogènes, le contrôle de l'ouverture de la double hélice apparaît alors cruciale chez les organismes vivant à hautes températures. Sans un tel contrôle strict de l'ouverture, nous pourrions imaginer que la fusion des deux brins se poursuive jusqu'à la dénaturation totale du duplexe si celui-ci était dépourvu de protéines présentant de l'affinité pour l'ADN. Comme nous l'avons déjà évoqué au chapitre II de l'introduction de cette thèse, la double hélice est en partie structurée par les protéines chromatinienne. Des petites protéines basiques telles que Alba ou Sul7d, en s'associant à la double hélice, limitent sa dénaturation (Lurz *et al.*, 1986 ; Baumann *et al.*, 1994). De plus, les euryarchées hyperthermophiles compactent leur génome sous forme de nucléosomes *via* des protéines histones favorisant ainsi une structure double brin plutôt que simple brin. C'est ce qui a été montré *in vitro* par l'ajout de la protéine histone HMF sur de l'ADN linéaire. La température de dénaturation est augmentée suggérant ainsi que cette association stabilise la molécule d'ADN (Sandman *et al.*, 1990).

Toutefois, un fonctionnement plus dynamique, coordonné avec les machineries cellulaires agissant sur l'ADN serait également requis. Les ADN topoisomérases, enzymes capables de moduler la topologie de l'ADN en fonction des conditions environnementales, sont donc aptes à contrôler l'état topologique et participent aussi au maintien de l'intégrité du génome.

2/ Réparation de l'ADN

L'Uracile-DNA glycosylase, découverte en premier chez *E. coli*, est à l'origine de l'excision des uraciles résultant de la désamination des cytosines (Lindahl, 1974). Aussi bien chez les bactéries que chez les levures, la délétion du gène codant cette enzyme conduit à l'augmentation de 10 à 20 fois du taux de mutation spontanée provenant de la désamination d'un résidu cytosine (Duncan *et al.*, 1978 ; Chen et Lacks, 1991 ; Impellizzeri *et al.*, 1991). Il en est de même pour l'hypoxanthine-DNA glycosylase qui excise les adénines ayant subi une désamination (Dianov et Lindahl, 1991). Ces enzymes sont universelles car elles sont également retrouvées chez les archées et notamment des organismes hyperthermophiles comme l'archée *Pyrobaculum aerophilum* (Aravind *et al.*, 1999 ; Yang *et al.*, 2000). Ces glycosylases, parmi d'autres, sont impliquées dans le système de réparation par excision des bases (ou BER pour *Base Excision Repair*). Quel que soit le domaine du vivant, ces enzymes reconnaissent un type de modification de base et catalysent l'excision de la base modifiée. Ce système de réparation permet une réparation extrêmement fidèle lorsque l'ADN n'est pas en cours de réplication (Lindahl *et al.*, 1997 ; Lindahl, 2013).

Contrairement à *E. coli* qui possède des systèmes de réparation inductibles (Courcelle *et al.*, 2001), l'expression de la plupart des protéines impliquées dans la réparation des dommages liés aux irradiations aux UV ou aux rayonnements gamma est constitutive que ce soit chez les *Crenarchaeota* (Götz *et al.*, 2007 ; Quaiser *et al.*, 2008 ; Thèse de Sharon Larmony, réalisée au laboratoire, 2007) ou chez les *Euryarchaeota* (Gérard *et al.*, 2001 ; Jolivet *et al.*, 2003 ; Baliga *et al.*, 2004). En revanche, une étude récente met en évidence une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la recombinaison homologue après une irradiation aux rayons gamma (Rolfmeier *et al.*, 2011). Par exemple, l'expression du gène codant la recombinase RadA est augmentée d'un facteur 2 à 3,5 suivant l'espèce de *Sulfolobus* considérée. Cette étude propose l'existence d'une autre voie de réparation qui impliquerait des éléments contrôlant la transcription (Rolfmeier *et al.*, 2011).

C- La reverse gyrase

1/ Marqueur de la thermophilie

C'est en 1984 que pour la première fois une activité de surenroulement positif fut décrite chez le *crenarchaeon* hyperthermophile *S. acidocaldarius* (Kikuchi et Asai, 1984). Cette activité fut initialement attribuée à une ADN topoisomérase de type II nommée alors « reverse gyrase » (Kikuchi et Asai, 1984) mais il fut rapidement montré qu'elle modifiait le nombre de liens topologiques en clivant un seul brin d'ADN par cycle catalytique ce qui en fit alors une ADN topoisomérase de type I (Forterre *et al.*, 1985 ; Nakasu et Kikuchi, 1985). La reverse gyrase est la seule ADN topoisomérase jamais décrite capable d'augmenter le nombre de liens topologiques entre les deux brins en introduisant des supertours positifs : cette activité est dépendante de l'ATP et du magnésium (Kikuchi et Asai, 1984 ; Mirambeau *et al.*, 1984 ; Forterre *et al.*, 1985). Une autre particularité de cette ADN topoisomérase est d'être une protéine chimère. En effet, elle présente à son extrémité carboxy-terminale un domaine ADN topoisomérase IA caractérisé par la présence du *topofold* (Duguet *et al.*, 2006) lié à un domaine amino-terminal hélicase présentant des motifs des hélicases de la super famille de type 2 (Confalonieri *et al.*, 1993 ; Jaxel *et al.*, 1996 ; pour une revue Nadal, 2007). Malgré la présence de ce domaine, aucune activité hélicase *stricto sensu* n'a pu être mise en évidence que ce soit en utilisant le domaine amino-terminal recombinant seul ou la reverse gyrase recombinante entière (Déclais *et al.*, 2000).

La mise en évidence d'un ADN hyper-surenroulé positivement chez un virus de Sulfolobales a, pour la première fois, permis d'envisager l'existence de cette activité de surenroulement positif *in vivo* (Nadal *et al.*, 1986). La recherche de cette activité enzymatique unique a par la suite été retrouvée au sein d'organismes hyperthermophiles appartenant aussi bien au domaine des *Bacteria* qu'au domaine des *Archaea* (Bouthier de la Tour *et al.*, 1990 ; Bouthier de la Tour *et al.*, 1991). Au début des années 2000, l'analyse des génomes alors disponibles montra que le gène codant la reverse gyrase était uniquement et systématiquement retrouvé chez les organismes hyperthermophiles, qu'ils soient bactériens ou archéens (Forterre, 2002). Il a été découvert, relativement récemment, que des organismes thermophiles modérés possèdent également ce gène (Brochier-Armanet et Forterre, 2006 ; Campbell *et al.*, 2009). Ainsi, la reverse gyrase fut et reste encore considéré comme le marqueur de la thermophilie.

C'est parce que le surenroulement positif est une caractéristique exclusive de la reverse gyrase que cette activité est considérée comme une fonction biologique majeure. Cependant, contrairement aux bactéries mésophiles et aux eucaryotes, le niveau de surenroulement des plasmides d'archées hyperthermophiles est variable allant du relâché au surenroulé positif (López-García et Forterre, 1997) ce qui soulève la question quant à la nécessité d'avoir un ADN surenroulé positivement pour les organismes hyperthermophiles. Par ailleurs, l'augmentation des données génomiques a aussi permis de mettre en évidence que certains hyperthermophiles, comme les Thermoplasmatales et certains Thermotogales, ne possèdent pas de gène codant la reverse gyrase (Brochier-Armanet et Forterre, 2006). Malgré cela, de nombreuses études suggèrent que la reverse gyrase soit essentielle pour la vie à haute température.

2/ La reverse gyrase est-elle essentielle pour la vie à haute température ?

Dès la découverte de son activité unique, la reverse gyrase fut associée à la possibilité de vivre à haute température en limitant la fusion des deux brins (Kikuchi et Asai, 1984 ; Nadal *et al.*, 1986 ; Forterre *et al.*, 1996). Cette hypothèse est reprise encore aujourd'hui (Nadal, 2007 ; Heine et Chandra, 2009 ; Perugino *et al.*, 2009). Relativement récemment, des organismes thermophiles modérés possédant le gène codant la reverse gyrase furent mis en évidence à proximité des cheminées hydrothermales (Campbell *et al.*, 2009). Ces biotopes sont caractérisés par de rapides fluctuations de températures ce qui implique, pour les organismes qui colonisent ce type d'environnement, de pouvoir s'adapter rapidement. Il a d'ailleurs été montré que l'expression du gène codant la reverse gyrase chez *Nautilia profundicola* est fortement induite en réponse à une augmentation de la température (Campbell *et al.*, 2009). A travers cette étude il semble donc que la reverse gyrase confère un avantage sélectif aux organismes vivant à hautes températures. Le rôle de la reverse gyrase dans la vie à haute température fut remis en question avec une étude menée chez l'euryarchéon hyperthermophile *T. kodakaraensis* où l'obtention d'un mutant de délétion du gène codant la reverse gyrase a été rapportée (Atomi *et al.*, 2004). Dans cette étude, les taux de croissance de la souche sauvage et de la souche mutante ont été comparés à différentes températures allant de 60°C à 93°C. De 60°C à 75°C les taux de croissance pour les deux souches sont relativement comparables alors que la délétion du gène codant la reverse gyrase entraîne une diminution d'un facteur 2 du taux de croissance pour des températures de 80, 85

et 90°C. A 93°C, la délétion semble létale puisque le mutant ne peut plus croître (Atomi *et al.*, 2004). Si l'absence de la reverse gyrase n'a pas de conséquence sur la croissance de *T. kodakaraensis* pour des températures relativement basses (60°C à 75°C), il en est autrement pour les températures plus élevées (80°C à 93°C) où la vitesse de croissance est la plus élevée notamment pour la souche sauvage. En revanche, la situation est radicalement différente chez le *crenarchaeon* hyperthermophile *S. islandicus* qui possède deux gènes de reverse gyrase, *topR1* et *topR2*. En effet, il a été récemment montré que chacun de ces deux gènes est essentiel chez cet organisme (Zhang *et al.*, 2013). Il semble donc que la reverse gyrase soit liée à la vie à haute température et/ou à des fonctions essentielles relatives à l'activité cellulaire globale.

3/ Présentation des différents rôles proposés pour la reverse gyrase

Bien que la reverse gyrase semble avoir un rôle clé dans le maintien de la stabilité des génomes chez les hyperthermophiles, son rôle précis au sein des cellules reste encore à élucider (Perugino *et al.*, 2009). Toutefois, les différentes caractérisations *in vitro* combinées aux études *in vivo* visant à apporter des informations sur les modes de régulations et sur l'identité des partenaires permettent de formuler des hypothèses concernant les fonctions potentielles de la reverse gyrase.

Implication possible de la reverse gyrase dans l'homéostasie du surenroulement

Chez les organismes hyperthermophiles, l'activité de surenroulement positif médiée par la reverse gyrase est une activité qui peut contribuer à maintenir un niveau de surenroulement compatible avec les processus de manipulation de l'ADN à hautes températures. La caractérisation des reverse gyrases TopR1 et TopR2 de *S. solafataricus* a montré que ces deux enzymes introduisent toutes les deux des supertours positifs mais *via* un mécanisme enzymatique distinct et répondant différemment à la température (Bizard *et al.*, 2011). TopR1 est une enzyme distributive, active sur une large gamme de température (de 60°C à 90°C) et dont l'activité augmente avec la température. En revanche, TopR2 est une enzyme très processive qui a une gamme de température optimale plus restreinte (de 60°C à 75°C) et introduit un nombre très élevé de supertours positifs (Bizard *et al.*, 2011).

Ces caractéristiques *in vitro* sont en accord avec l'implication de TopR1 dans le contrôle homéostatique du surenroulement chez *S. solfataricus* comme suggéré

précédemment par l'équipe (Garnier et Nadal, 2008). Dans cette étude, un rapide ajustement du niveau d'expression de *topR1* fut observé lors d'un changement de température de croissance alors que l'expression de *topR2* reste inchangée (Garnier et Nadal, 2008). Dans le cas où TopR1 serait impliquée dans le contrôle homéostatique du surenroulement chez *S. solfataricus*, son activité de surenroulement positif devrait être contrecarrée par une enzyme possédant une activité antagoniste. Les archées hyperthermophiles possèdent une telle ADN topoisomérase. Il s'agit de l'ADN topoisomérase VI, qui est une enzyme de type II. Elle est capable à la fois de relâcher les supertours négatifs et les supertours positifs (Bergerat *et al.*, 1994). Le couple TopR1/Topo VI pourrait donc être responsable de la régulation homéostatique du surenroulement chez les hyperthermophiles.

La reverse gyrase protège l'ADN contre la dénaturation thermique

Chez les organismes vivant à hautes températures, le contrôle dynamique de l'ouverture de la double hélice est un des enjeux majeurs. Compte tenu de son activité unique et de sa répartition dans le monde vivant, la reverse gyrase fut tout de suite associée à la stabilisation de duplexes d'ADN contre la dénaturation thermique (Kikuchi et Asai, 1984 ; Nadal *et al.*, 1986). En plus de cette activité, il a été montré que la reverse gyrase est capable d'apparier deux brins d'ADN en se liant à une région simple brin (Slesarev et Kozyavkin, 1990). Ce résultat est retrouvé plus récemment pour la reverse gyrase d'*Archaeoglobus fulgidus*. En effet il a été montré que cette reverse gyrase a la capacité d'associer *in vitro* des cercles d'ADN simple brin et d'introduire des supertours positifs dans de l'ADN contenant une bulle (Hsieh et Plank, 2006). Par cette activité de renaturation, la reverse gyrase pourrait avoir un rôle d'ADN renaturase (Slesarev et Kozyavkin, 1990 ; Hsieh et Plank, 2006).

Par ailleurs, la reverse gyrase limiterait la thermodégradation d'un duplexe d'ADN indépendamment de son activité de surenroulement positif en s'associant physiquement aux dommages induits par les températures élevées. Ainsi, il a été proposé que la formation de nucléofilaments reverse gyrase-ADN participerait à la stabilisation de l'ADN en réduisant l'apparition de sites abasiques ou de coupures dans le squelette désoxyribose-phosphate, dommages qui sont augmentés à hautes températures (Kampmann et Stock, 2004). Néanmoins, ce rôle de thermoprotection fut mis en évidence *in vitro* pour un ratio protéine sur ADN important (de 10 à plus). Dans un modèle de thermoprotection de l'ADN *in vivo* médié par la reverse gyrase cette enzyme serait donc présente en quantité élevée et serait recrutée dynamiquement au niveau des dommages. En venant se fixer aux dommages, il est proposé

que la reverse gyrase stabilise le duplexe d'ADN et intervienne dans le recrutement de protéines impliquées dans les systèmes de réparation (Kampmann et Stock, 2004). Cette signalisation serait due à la formation des nucléofilaments ou à une intervention directe de la reverse gyrase dans la réparation de l'ADN.

La reverse gyrase est impliquée dans les processus de réparation de l'ADN

Les ADN topoisomérases IA sont universelles. Il est admis qu'elles participent, en association avec les hélicases de la super famille de type 2, à la stabilité des génomes (Jaxel *et al.*, 1996). La nature même de la reverse gyrase composée au sein d'un seul polypeptide du domaine ADN topoisomérase IA et du domaine hélicase de la super famille de type 2 suggère un rôle de cette enzyme dans les processus de la réparation de l'ADN.

Différentes études indiquent une participation de la reverse gyrase dans les réponses cellulaires suite à la formation de dommages dans l'ADN. Lors d'une irradiation du *crenarchaeon* hyperthermophile *S. solfataricus* aux UV, un recrutement de la reverse gyrase au niveau des dimères de thymines ainsi générés a été mis en évidence (Napoli *et al.*, 2004). Il a également été montré que cette enzyme recrutée préserve son activité suggérant ainsi que la prise en charge de ce type de dommage nécessite l'introduction de supertours positifs (Napoli *et al.*, 2004). Cette hypothèse est confortée par le fait qu'*in vitro*, la liaison ainsi que l'activité de clivage de la reverse gyrase sur des substrats irradiés aux UV est amplifiée par la protéine SSB (*Single-Strand Binding protein*), protéine connue pour être impliquée dans la réparation de l'ADN (Napoli *et al.*, 2005). De plus, la protéine SSB stimule l'activité de surenroulement positif de la reverse gyrase et est retrouvée *in vivo* associée à la reverse gyrase (Napoli *et al.*, 2005 ; Cubeddu et White, 2005).

Plus récemment, il a été montré qu'en plus de la protéine SSB, la reverse gyrase est également capable d'interagir avec l'ADN polymérase translésionnelle de *S. solfataricus* (Valenti *et al.*, 2009). Cette famille d'ADN polymérase joue un rôle essentiel dans la réponse aux dommages et est retrouvée au sein des trois domaines du vivant. De par son activité, elle possède un fort potentiel mutagène qu'il est important de contrôler. *Via* son interaction avec la polymérase translésionnelle, la reverse gyrase pourrait jouer ce rôle, et ce d'autant plus qu'il a été montré *in vitro* qu'elle inhibait la polymérase translésionnelle et que son activité de surenroulement positif pouvait être requise pour médier cette inhibition (Valenti *et al.*, 2009).

Un autre niveau de régulation de l'ADN polymérase translésionnelle mis en évidence dans cette étude est la dégradation *in vivo* du complexe reverse gyrase - ADN polymérase translésionnelle (Valenti *et al.*, 2009). Il est alors possible d'imaginer que la reverse gyrase

limite l'activité potentiellement mutagène de l'ADN polymérase translésionnelle suivant ces deux mécanismes. Enfin, il a été montré qu'en réponse à un traitement au MMS, agent génotoxique de type alkylant, une dégradation spécifique de la reverse gyrase précédant la fragmentation du génome de *S. solfataricus* a été observé. L'enzyme responsable de cette dégradation spécifique de la reverse gyrase est une métallo-protéase dont la caractérisation reste encore à effectuer. Cependant, il semblerait qu'elle dégrade la reverse gyrase suite à l'induction de dommages dans l'ADN (Valenti *et al.*, 2006).

Les différentes études présentées furent principalement menées chez le *crenarchaeon* hyperthermophile *S. solfataricus* qui possède comme la plupart des *Crenarchaeota*, deux copies du gène codant la reverse gyrase. Néanmoins dans ces études, la distinction entre les deux reverse gyrases TopR1 et TopR2 n'a pas été effectuée. Récemment, il a été montré que TopR1 est capable de dissocier des jonctions à quatre branches mimant des jonctions de Holliday et cela sans avoir besoin d'ATP, ce qui suggère que TopR1 jouerait un rôle dans la recombinaison (Valenti *et al.*, 2010). Les études menées *in vitro* ont été faites avec TopR1 mais *in vivo*, en raison de la non spécificité des anticorps, il est impossible de savoir si c'est seulement TopR1 qui a cette activité ou TopR2 ou les deux.

Présentation du travail

Du fait de l'universalité et du pleiotropisme des ADN topoisomérases, il est difficile d'identifier leur(s) fonction(s) précise(s) dans les différents processus cellulaires liés au métabolisme de l'ADN tels que la transcription, la réplication, la ségrégation des chromosomes et la recombinaison/réparation. Aussi, comprendre quels sont leurs différents niveaux de régulation est un enjeu majeur.

Dans cette dynamique, l'objectif général mené par l'équipe « Régulation des ADN topoisomérases » au sein de laquelle j'ai effectué cette thèse est de clarifier le rôle de chaque ADN topoisomérase du crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2 (souche DSMZ 1617). Ce crenarchaeon a été isolé en 1980 à partir des sources thermales acides de Pisciarelli en Italie (Zillig *et al.*, 1980) et appartient au genre *Sulfolobus*, du latin : « *sulfur* » qui désigne le nom « soufre » et « *lobus* » qui fait référence aux lobes formés par les cellules (Brock *et al.*, 1972). Le séquençage de son génome a permis de mettre en évidence la présence de deux gènes, *top6A* et *top6B*, codant chacun une sous-unité de la topoisomérase de type II, la topoVI ainsi que trois autres gènes codant les trois ADN topoisomérases IA, les gènes *topR1* et *topR2* codant chacun une reverse gyrase, et le gène *topA*, spécifiant une ADN topoisomérase IA classique (She *et al.*, 2001). Depuis plusieurs années, le laboratoire s'intéresse à la famille des ADN topoisomérases IA pour son universalité ainsi que pour son implication dans la stabilité des génomes. Le fait que la duplication du gène codant la reverse gyrase soit conservée chez la plupart des représentants des *Crenarchaeota* indique l'importance de chacune des copies et constitue un avantage stratégique pour comprendre son rôle chez les hyperthermophiles.

La redondance de chacun des grands types de topoisomérases existe chez de nombreux organismes. Chez l'homme, des isoformes des ADN topoisomérases IA et de type II sont retrouvées. De même chez la bactérie *E. coli*, il a été montré que l'existence d'une seconde ADN topoisomérase de type IA, TopB, se sur-ajoute à celle de TopA, et qu'en plus de l'ADN gyrase (GyrA-GyrB), une seconde ADN topoisomérase de type II, la topoisomérase IV (ParE-ParC) a été mise en évidence. Dans l'exemple de la bactérie *E. coli*, bien que les activités *in vitro* de TopA/TopB d'un côté et de l'ADN gyrase/Topo IV de l'autre soient proches, leurs rôles sont différents : TopA participe à la régulation homéostatique du surenroulement alors que TopB, en s'associant avec l'hélicase RecQ, intervient dans la stabilité des génomes ; la Topo IV est majoritairement responsable de la décaténation des chromosomes en fin de réplication contrairement à l'ADN gyrase, elle aussi impliquée dans la

régulation homéostatique du surenroulement. Ainsi, si la redondance des gènes *topA* et *topB* d'une part, et *gyrA-gyrB* et *parE-parC* d'autre part, résulte d'une duplication ancienne, chaque copie de gènes aurait évolué indépendamment pour coder une protéine qui se serait spécialisée dans une fonction particulière au cours de l'évolution.

L'hypothèse privilégiée du laboratoire est que la duplication du gène codant la reverse gyrase chez le crenarchaeon hyperthermophile *S. solfataricus* mène à une spécialisation de chacune (sub-fonctionnalisation). Une étude menée à l'échelle transcriptomique chez une autre Sulfolobale (*S. acidocaldarius*) montre que l'expression de *topR1* est constante en fonction du cycle cellulaire alors que celle de *topR2* augmente transitoirement lors de la transition G1/S (Lundgren et Bernander, 2007). De même, les travaux effectués au laboratoire sur la régulation transcriptionnelle des deux gènes *topR1* et *topR2* de *S. solfataricus* montrent que leurs profils d'expression sont différents suite à des changements de températures (Garnier et Nadal, 2008). De plus, l'étude comparative des propriétés enzymatiques de TopR1 et TopR2 révèle des différences notables, mettant ainsi en évidence deux types de reverse gyrases (Bizard *et al.*, 2011). Ces trois études appuient l'hypothèse selon laquelle TopR1 et TopR2 auraient des fonctions biologiques différentes.

Afin de préciser davantage l'implication des différentes ADN topoisomérases de *S. solfataricus*, et plus particulièrement des deux reverse gyrases, l'objectif principal de ma thèse était de comparer leur régulation au niveau protéique suivant différents *stimuli*. Or, les deux reverse gyrases étant relativement proches du point de vue de leurs séquences en acides aminés (35% d'identité) (Figure 14), le challenge fut d'obtenir des anticorps capables de les distinguer dans les cellules de *S. solfataricus*. La stratégie alors adoptée par le laboratoire fut de trouver des épitopes exclusivement présents dans la séquence protéique de l'ADN topoisomérase considérée. En plus de la comparaison de la régulation des deux reverse gyrases, j'ai également pu observer les effets des différentes conditions expérimentales sur la croissance et, ponctuellement, sur la réplication et la division cellulaire de *S. solfataricus*.

Comme nous l'avons vu, les ADN topoisomérases sont des enzymes intervenant dans le métabolisme de l'ADN. Or celui-ci peut être modulé par des paramètres physico-chimiques ainsi qu'en fonction de l'état physiologique des cellules. En effet, suivant que les cellules se divisent plus ou moins activement lors de la croissance continue de *S. solfataricus*, le métabolisme de l'ADN correspondant est par conséquent plus ou moins sollicité. Il était donc important de suivre les variations protéiques des quatre ADN topoisomérases, et de manière plus précise des deux reverse gyrases, tout au long de la croissance de *S. solfataricus*. Si le

temps de génération le plus court de *S. solfataricus* se situe à une température voisine de 80°C, cet organisme est capable de se diviser dans une large gamme de températures définie dans la littérature comme allant de 55°C à 90°C (Brock *et al.*, 1972 ; Grogan, 1989). Puisque le taux de croissance est dépendant de la température, nous avons également voulu savoir si les variations des deux reverse gyrases observées aux différentes phases de croissance à 80°C étaient conservées pour des phases similaires mais obtenues à des températures de croissance différentes (60°C, 72°C et 88°C).

Dans le système bactérien, la régulation homéostatique du surenroulement est prise en charge par les activités antagonistes de l'ADN topoisomérase I (TopA) et de l'ADN gyrase et constitue un processus important dans le contrôle de l'expression des gènes. Bien que peu de données illustrent l'existence de cette régulation chez les eucaryotes et les archées, il est néanmoins fort probable que l'expression des gènes, chez l'ensemble des organismes vivants, soit contrôlée par ce type de régulation. Compte tenu du fait que *S. solfataricus* possède deux reverse gyrases, un de mes objectifs fut de mettre en évidence leur implication respective dans la régulation homéostatique du surenroulement de l'ADN *in vivo* en suivant leur niveau protéique par immuno-détection. Et, afin d'avoir une vision globale de cette régulation, j'ai décidé d'inclure l'étude des variations quantitatives de l'ADN topoisomérase VI. Ainsi, un modèle de régulation homéostatique du surenroulement chez *S. solfataricus* est proposé dans cette thèse.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction (chapitre IV « Thermophilie et Reverse gyrase »), la reverse gyrase est considérée comme un avantage sélectif pour la vie à haute température sans pour autant que son rôle soit clairement établi. Lors de l'étude des caractéristiques enzymatiques des deux reverse gyrases de *S. solfataricus* menée au laboratoire, il a été montré que TopR1 et TopR2 présentent un comportement différent vis-à-vis des hautes températures (Bizard *et al.*, 2011). Afin d'apporter une réponse claire quant à l'implication de la reverse gyrase dans la vie à haute température, et toujours dans un souci d'élucider le rôle de chaque reverse gyrase, nous nous sommes placés *in vivo* dans des conditions où la température est suffisamment basse pour bloquer la division cellulaire de *S. solfataricus*. Il nous a alors été possible de déterminer qu'une seule reverse gyrase est intimement liée à la vie à haute température. Les résultats obtenus nous ont également permis d'avancer d'autres éléments de réponse quant à l'implication de la seconde reverse gyrase dans la stabilité des génomes.

Pour aller plus loin dans la mise en évidence des fonctions différentes de TopR1 et TopR2, une des pistes est d'identifier les partenaires protéiques. Il faut pour cela pouvoir

isoler des complexes protéiques qui résultent de l'interaction entre la protéine d'intérêt (TopR1 ou TopR2) et un ou plusieurs partenaires. Ces complexes protéiques peuvent être identiques ou différents selon les conditions de croissance de l'organisme et selon les processus cellulaires mis en jeu. Un des moyens d'accéder à la purification de ces complexes protéiques repose sur l'utilisation d'anticorps spécifiques et correspond à la technique d'immuno-précipitation. C'est dans ce cadre que j'ai initié la mise au point d'un protocole d'immuno-précipitation des complexes protéiques impliquant TopR1. La mise au point d'un protocole d'immuno-précipitation utilisant les anticorps anti-TopR2 est en cours. L'identification des partenaires protéiques permettra de déterminer l'implication de TopR1 et/ou TopR2 dans un ou plusieurs processus cellulaires, qu'ils soient constitutifs ou plus spécifiquement déclenchés par un *stimulus* particulier.

Enfin, une autre piste nous permettant de mettre en évidence d'autres fonctions des reverse gyrases serait d'analyser le phénotype de *S. solfataricus* au sein duquel une seule reverse gyrase serait fonctionnelle. Or, nous savons que la mutation de chacune des reverse gyrases chez une souche très proche (*S. islandicus*) ne permet pas d'obtenir des mutants viables (Zhang *et al.*, 2013). Aussi l'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques spécifiques serait un outil précieux pour appréhender l'étude des fonctions des reverse gyrases par un autre biais. Malheureusement, s'il existe de nombreux inhibiteurs connus pour agir sur les topoisomérases de type II ou IB, il n'en est pas de même pour les topoisomérases de type IA. Ainsi, en collaboration avec l'équipe de Jean-François Riou du MNHN, j'ai mené une étude préliminaire quant à l'inhibition potentielle de l'activité de relaxation de l'ADN topoisomérase IA classique, TopA, par deux molécules. Notre choix s'est porté dans un premier temps sur cette enzyme car son activité *in vitro* est plus facilement interprétable que celles des reverse gyrases. Les résultats préliminaires obtenus indiquent que ces deux molécules ont un effet inhibiteur sur l'activité de TopA. Cela nous encourage à poursuivre cette étude pour *in fine* obtenir des réponses quant à l'implication de TopA *in vivo* en fonction de l'état physiologique des cellules ou d'une condition environnementale particulière.

RESULTATS

- I- Phases de croissance à différentes températures
- II- Régulation homéostatique du surenroulement de l'ADN
 - III- A basse température
 - IV- Résultats complémentaires

Le proverbe « On sait ce que l'on perd mais on ne sait pas ce que l'on retrouve » peut être interprété dans le sens où tout départ d'une situation donnée nous plonge dans l'inconnu.

Aussi, il m'a semblé important, dans un premier temps, de décrire la croissance de *Sulfolobus solfataricus* P2 lorsque celui-ci est maintenu à une température donnée ainsi que d'estimer le contenu en reverse gyrases pour interpréter, dans un deuxième temps, leurs modifications en réponse à des variations de température de faible puis de forte amplitudes. Enfin, les résultats complémentaires permettant d'étendre mon sujet clôturent la partie « Résultats » de cette thèse.

I- Etude des variations quantitatives des ADN topoisomérase IA de *S. solfataricus* suivant les phases de croissance à différentes températures

La caractérisation de l'espèce *Sulfolobus solfataricus* P2 a été effectuée en 1980 (Zillig *et al.*, 1980) et poursuivie au travers de l'étude phénotypique de cinq espèces appartenant au genre *Sulfolobus* (Grogan, 1989). Cette étude rapporte que la température à laquelle le temps de génération optimal de *Sulfolobus solfataricus* P2 est atteint aux alentours de 80°C et qu'il cesse de se diviser à 90°C (Grogan, 1989). Si la température limite haute est donnée, aucune information n'est apportée quant à la température minimale de croissance (Grogan, 1989). Néanmoins, nous pouvons prendre en compte la règle simple et arbitraire qui dit qu'aucun organisme hyperthermophile n'est capable de se développer en dessous de 60°C (Stetter *et al.*, 1990).

Nous avons vu que la topologie varie en fonction du métabolisme de l'ADN. En effet, suivant que la double hélice est plus ou moins sollicitée localement par les machineries de transcription et/ou de réplication, des contraintes topologiques vont être générées, celles-ci étant prises en charge par les différentes ADN topoisomérase. Le fait de retrouver trois ADN topoisomérase IA, dont deux reverse gyrase, au sein d'un même organisme tel que *S. solfataricus*, *crenarchaeon* hyperthermophile, soulève la question de leurs fonctions respectives mais peu d'études menées jusqu'à présent y répondent.

Le travail présenté dans les deux parties suivantes de cette thèse fait suite aux résultats obtenus par l'équipe sur l'expression des gènes *topR1* et *topR2* chez *S. solfataricus* (Garnier et Nadal, 2008). Cette étude a permis de montrer que les deux gènes, *topR1* et *topR2*, sont faiblement exprimés mais qu'ils sont néanmoins plus abondants lorsque les cellules se divisent activement. En revanche, ils sont pratiquement indétectables lorsque les cellules cessent de se diviser (Garnier et Nadal, 2008). Il semble donc que les deux reverse gyrase soient impliquées dans les variations topologiques survenant lorsque le métabolisme de l'ADN est actif, et en particulier lors de la réplication, la transcription, la réparation ou la recombinaison de l'ADN. Suite à la mise en évidence d'un premier niveau de régulation à l'échelle transcriptionnelle, nous nous sommes intéressés aux régulations ayant lieu à l'échelle protéique.

Afin de répondre au mieux à cette première question, nous avons choisi d'utiliser la technique d'immuno-détection en utilisant des anticorps dirigés spécifiquement contre chacune des deux reverse gyrases de *S. solfataricus*. Leur spécificité a été testée à la fois sur des fractions de protéines TopR1 et TopR2 recombinantes purifiées (Bizard *et al.*, 2011) ainsi que sur des extraits bruts issus de *S. solfataricus*. Les détails concernant la méthode ainsi que le résultat correspondant sont présentés Figure 3 de l'article page 259. En plus des anticorps spécifiquement dirigés contre TopR1 et TopR2, le laboratoire possède également des anticorps spécifiquement dirigés contre la troisième ADN topoisomérase IA de *S. solfataricus* TopA. Cependant, cette protéine n'a jamais été détectée dans les différentes conditions expérimentales testées au cours de ces travaux de thèse. Ce résultat soulève plusieurs questions qui seront discutées à la fin de cette partie. Ainsi, dans notre première étude, seules les variations quantitatives des deux reverse gyrases TopR1 et TopR2 ont été ciblées.

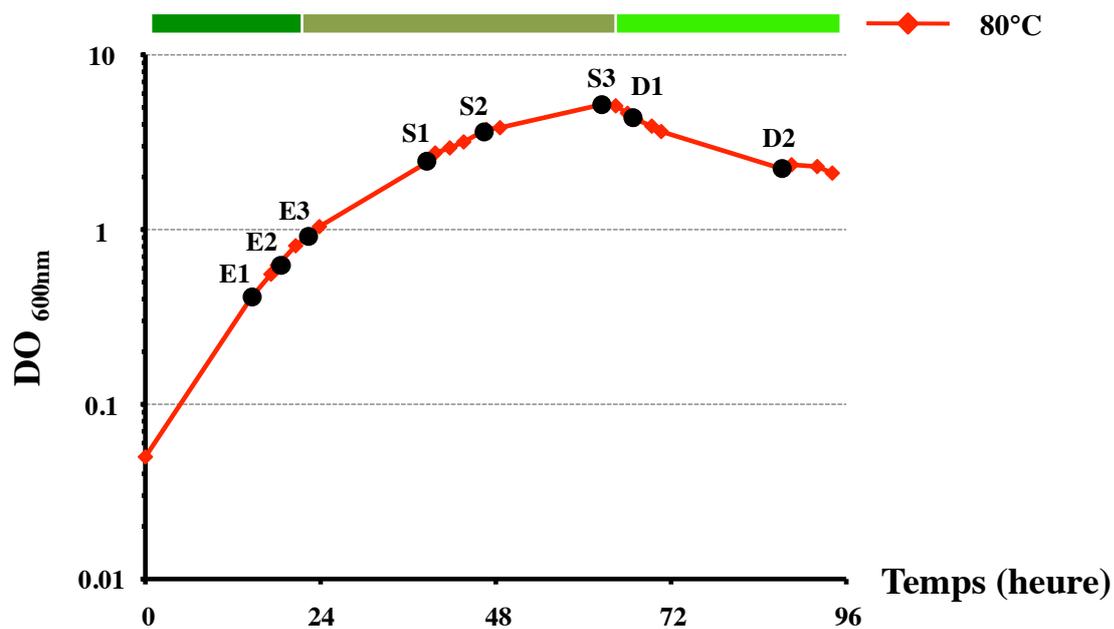


Figure 18- Courbe représentative de la croissance de *S. solfataricus* cultivé à 80°C.

Au cours de la croissance, trois phases principales sont identifiées : E pour phase exponentielle, S pour phase de ralentissement et D pour phase de déclin. La durée arbitraire de ces trois grandes phases est symbolisée par un rectangle de couleur vert au dessus de la courbe. La progression de la phase E puis S et D suit un dégradé de vert allant du plus foncé au plus clair. Au sein de ces trois phases, des subdivisions arbitraires sont indiquées : E1, S1 et D1 pour les phases précoces, E2, et S2 pour les phases intermédiaires, et E3, S3 et D2 pour les phases tardives. La croissance est suivie par mesure de la DO à 600 nm, dont les valeurs sont reportées sur une échelle logarithmique.

Régulation des reverse gyrases TopR1 et TopR2 en fonction de la croissance de *S. solfataricus* à 80°C

Croissance de *S. solfataricus* à 80°C.

Classiquement, la température optimale de croissance de *S. solfataricus*, c'est-à-dire la température à laquelle le temps de génération est le plus court, est considérée comme étant aux alentours de 80°C (Grogan, 1989). Nous avons choisi cette température de 80°C comme la température de référence pour chacune de nos études présentées dans cette thèse.

La croissance de *S. solfataricus* est donc réalisée à 80°C et est mesurée par turbidimétrie à 600 nm. Une courbe de croissance représentative est présentée Figure 18. La courbe de croissance de *S. solfataricus* ne suit pas un tracé habituellement observé pour des micro-organismes couramment utilisés en laboratoire comme la levure ou la bactérie *E. coli* dans la mesure où il n'y a pas de phase stationnaire. Toutefois, cette courbe de croissance peut être divisée en trois phases principales : une phase exponentielle, une phase de ralentissement et une phase de déclin notées respectivement E, S et D. Ces trois phases sont représentatives d'un état physiologique différent des cellules. Chacune de ces phases a été subdivisée en phases dites précoces (E1, S1 et D1), intermédiaires (E2 et S2) et tardives (E3, S3 et D2) (Figure 18). Leur délimitation relativement arbitraire prend en compte un changement de pente reflétant une modification du taux de division. La phase exponentielle précoce est plutôt courte et dure environ 5-6 heures. Durant cette période, le taux de division des cellules est le plus rapide, avec un temps de génération d'approximativement 5 heures. Ce temps de génération augmente au fur et à mesure que les cellules atteignent les phases tardives de la phase de ralentissement. Après avoir atteint une densité cellulaire maximale (DO_{600nm} aux alentours de 5-6), les cellules entrent alors brusquement dans une phase de déclin (Figure 18). Bien que cette phase de déclin soit un état physiologique qui reste à définir, la chute de la densité optique peut être le résultat d'une lyse des cellules combinée ou non avec un arrêt de la division cellulaire.

Variations quantitatives des reverse gyrases en fonction de la phase de croissance à 80°C.

Afin d'étudier les variations quantitatives éventuelles de TopR1 et de TopR2 chez *S. solfataricus* cultivé à 80°C, des prélèvements de cellules ont été réalisés aux différentes phases de croissance tel que présenté dans la Figure 18. Les extraits protéiques totaux correspondants ont été préparés pour chaque prélèvement. Les variations quantitatives issues

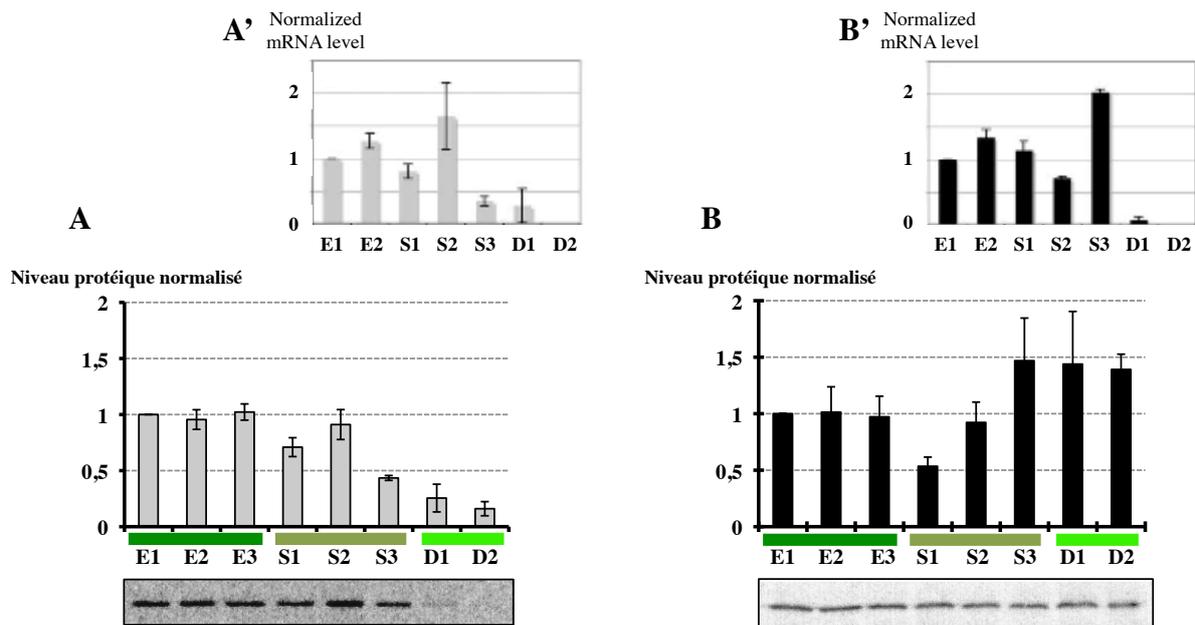


Figure 19- Variations quantitatives de TopR1 et de TopR2 en fonction de la phase de croissance de *S. solfataricus* cultivé à 80°C (extraits bruts).

Les cellules ont été prélevées à différentes phases de croissance indiquées par la légende E1, E2, E3, S1, S2, S3, D1 et D2. Les analyses quantitatives du signal d'immuno-détection de TopR1 (A) et de TopR2 (B) sont présentées sous forme d'histogrammes et sont le résultat de quatre expériences indépendantes. Les immunopreintes ayant servi à la quantification de TopR1 et de TopR2 dans les extraits bruts sont ajoutées en dessous des histogrammes correspondants. Une quantité protéique de 10 μg et de 50 μg ont été déposées pour la détection de TopR1 et TopR2 respectivement. Les quantités relatives de TopR1 et de TopR2 ont été pondérées par la quantité de protéines transférées sur la membrane de nitrocellulose et normalisées par rapport à la quantité de reverse gyrase correspondante détectée en E1.

Les histogrammes correspondant aux variations transcriptionnelles des gènes *topR1* (A') et *topR2* (B') obtenues dans les mêmes conditions expérimentales sont montrés pour comparaison (issues de l'article publié par Garnier et Nadal, 2008).

de l'immuno-détection de TopR1 et TopR2 en fonction de la phase de croissance à 80°C est montrée Figure 19. Nous voyons clairement que la quantité de TopR1 est stable durant toute la phase exponentielle (E1 à E3) puis diminue de 30% en S1 pour augmenter en S2 et atteindre une quantité de TopR1 comparable à celle obtenue en E1. En phase de ralentissement tardive (S3), le taux de TopR1 chute de nouveau pour atteindre 45% de la quantité initiale de TopR1. La diminution drastique de TopR1 se poursuit en phase de déclin avec moins de 15% de TopR1 en D2 (Figure 19A). Les variations de TopR1 observées de la phase exponentielle précoce (E1) à la phase de ralentissement intermédiaire (S2) sont également observées pour TopR2 (Figure 19B) bien qu'en phase S1 la diminution soit un peu plus prononcée pour TopR2 que pour TopR1 (un facteur 2 contre un facteur 1,3 respectivement). Les variations de TopR1 observées après la phase S2 sont spécifiques de TopR1 puisque la quantité de TopR2 augmente d'un facteur 1,5 en phase S3 et reste constante jusqu'à la fin de la croissance à 80°C (Figure 19B). En résumé, la différence essentielle entre TopR1 et TopR2 a lieu au niveau de la phase de déclin, phase durant laquelle un taux de TopR2 est maintenu élevé (Figure 19B) alors que celui de TopR1 est fortement diminué en D1 pour être quasiment indétectable en D2 (Figure 19A). Notre méthode de quantification tient compte de la quantité de protéines réellement transférées visualisée après coloration au rouge Ponceau de la membrane. En comparant les différents profils protéiques correspondants, nous n'avons constaté aucune variation quantitative significative des protéines totales, y compris pour des cellules en déclin (non montré). La disparition de TopR1 dans les extraits bruts des cellules en phase de déclin est donc vraisemblablement due à une dégradation spécifique de TopR1. La disparition de la protéine TopR1 suit la disparition du transcrit correspondant observée précédemment (Garnier et Nadal, 2008). En revanche, l'absence de transcrits du gène *topR2* ne permet pas d'expliquer le maintien de la protéine TopR2 en phase de déclin. Nos résultats obtenus à l'échelle protéique permettent de démontrer clairement l'existence d'une régulation différente des deux reverse gyrases en fonction de la phase de croissance, essentiellement lors de la phase de déclin.

Etant donné que la reverse gyrase a été retrouvée au niveau du nucléoïde suite à une irradiation de *S. solfataricus* aux UV (Napoli *et al.*, 2004), nous avons émis l'hypothèse que les deux reverse gyrases pouvaient également être régulées par une localisation sub-cellulaire au cours des différentes conditions expérimentales testées. Nous avons appliqué et adapté à nos conditions expérimentales le protocole de fractionnement cellulaire mis au point par l'équipe de C. Elie (Quaiser *et al.*, 2008).

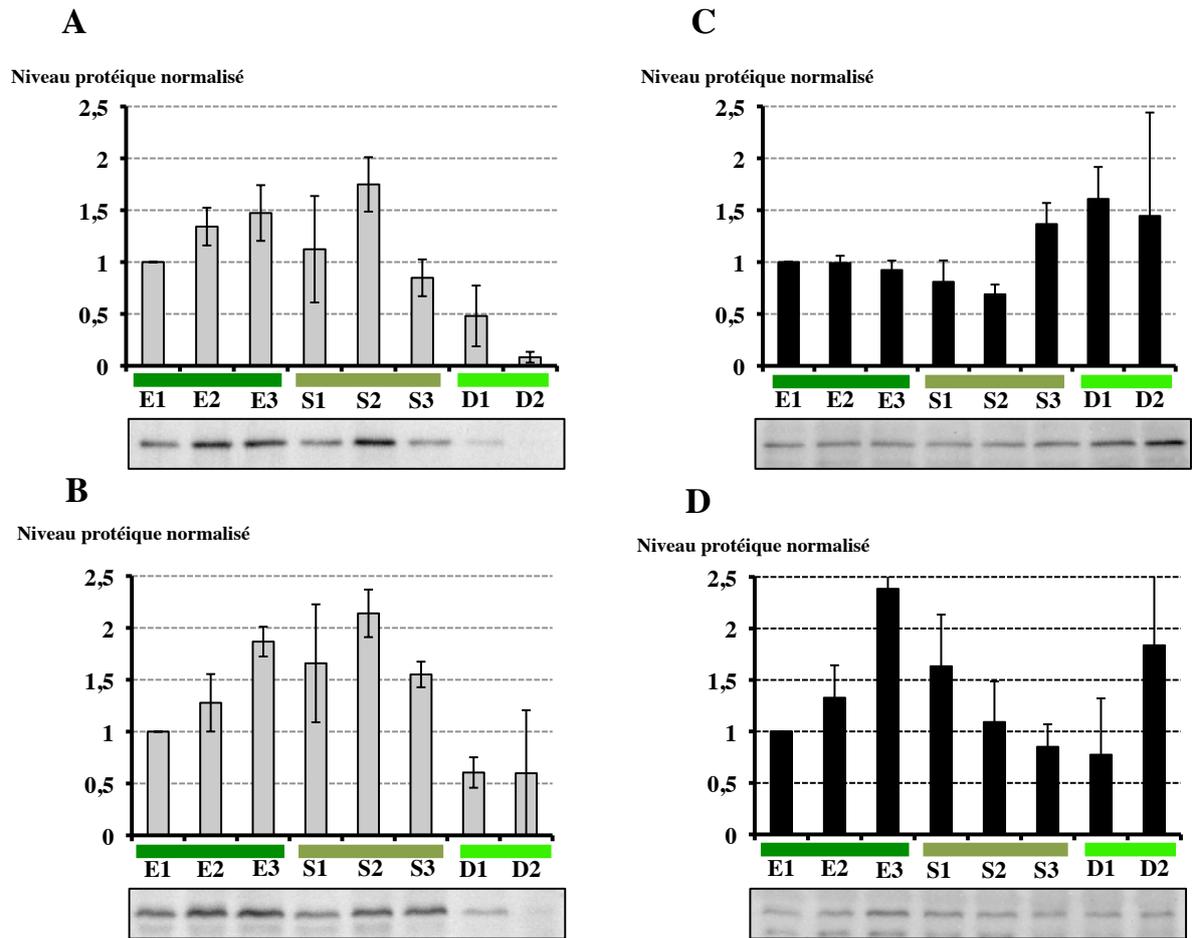


Figure 20- Variations quantitatives de TopR1 et de TopR2 en fonction de la phase de croissance de *S. solfataricus* cultivé à 80°C (fractions sub-cellulaires).

Les cellules ont été prélevées à différentes phases de croissance indiquées par la légende E1, E2, E3, S1, S2, S3, D1 et D2. Les analyses quantitatives du signal d'immuno-détection de TopR1 (A-B) et de TopR2 (C-D) sont présentées sous forme d'histogrammes et sont le résultat de quatre expériences indépendantes. Les immunopreintes ayant servi à la quantification de TopR1 et de TopR2 dans la fraction des protéines cytosoliques (A-C) et la fraction des protéines associées au nucléoïde (B-D) sont ajoutées en dessous des histogrammes correspondants. Une quantité protéique de 10 μg pour les fractions des protéines cytosoliques (A) et d'environ 75 μg équivalents pour la fraction des protéines associées au nucléoïde (basé sur la concentration déterminée pour les fractions des protéines cytosoliques correspondantes) (B) ont été déposées pour la détection de TopR1. Une quantité protéique de 50 μg a été déposée pour la détection de TopR2 et ce quelle que soit la fraction protéique (C-D). Les quantités relatives de TopR1 et de TopR2 ont été pondérées par la quantité de protéines transférées sur la membrane de nitrocellulose et normalisées par rapport à la quantité de reverse gyrase correspondante détectée en E1.

Nous avons également réalisé les contrôles nécessaires afin de s'assurer que le signal observé au niveau de la fraction des protéines insolubles représentait bien la part de reverse gyrase associée au nucléoïde. Nous avons alors entrepris l'étude de la localisation sub-cellulaire de TopR1 et de TopR2 en fonction de leur au cours de la croissance de *S. solfataricus* à 80°C.

Les échantillons protéiques sont issus de cellules collectées aux mêmes phases de croissance présentées à la Figure 18. Nous savons que la reverse gyrase est majoritairement présente dans la fraction cytosolique (Napoli *et al.*, 2004). Donc pour palier à la non détection de TopR1 dans les fractions des protéines associées au nucléoïde, nous avons choisi d'en déposer une plus grande quantité de protéines pour la détecter dans ce type de fraction protéiques. Les profils de variation quantitative de TopR1 dans les fractions des protéines cytosoliques (Figure 20A) et des protéines associées au nucléoïde (Figure 20B) évoluent globalement de la même façon que ceux détectés au sein des extraits totaux correspondants (Figure 19A). En revanche, il semble que celles observées pour TopR2 dans les extraits cytosoliques (Figure 20C) diffèrent de celles des fractions de protéines associées au nucléoïde (Figure 20D). Le taux de TopR2 dans la fraction des protéines cytosoliques semble diminuer dès la phase exponentielle tardive (E3) et ce de manière progressive jusqu'en phase de ralentissement tardive (S2). Elle augmente à nouveau en S3 pour rester stable jusqu'en D2 dans la fraction des protéines cytosoliques (Figure 20C). Le profil protéique de TopR2 obtenu dans la fraction des protéines cytosoliques est globalement similaire à celui obtenu dans les extraits totaux (Figure 20C comparée à Figure 19B). Dans la fraction des protéines associées au nucléoïde, la quantité de TopR2 augmente transitoirement avec un maximum atteint en E3, puis diminue jusqu'en D1 alors que le niveau de TopR2 est à nouveau élevé en phase D2 (Figure 20D). Cependant, les barres d'erreur correspondant à la détection de TopR2 dans les fractions de protéines associées au nucléoïde sont plus importantes que celles obtenues dans les deux autres fractions protéiques (extraits totaux et cytosoliques). Cela s'explique par le fait que nous ayons eu des difficultés à obtenir des résultats très reproductibles pour TopR2 lors des expériences de fractionnement cellulaire. Le problème peut venir de la mauvaise solubilisation de TopR2, d'une dégradation de celle-ci au moment de la préparation des échantillons et/ou la présence d'interactions faibles de la reverse gyrase avec le nucléoïde lui-même ou avec des composants associés au nucléoïde. Aussi, il est difficile d'obtenir des quantifications fiables dans les fractions de protéines associées au nucléoïde, et les différentes interprétations possibles sont à considérer comme très préliminaires. De ce fait, nous avons fait le choix de ne présenter, dans la suite de cette thèse, que les variations quantitatives des différentes ADN topoisomérases contenues dans les extraits protéiques totaux.

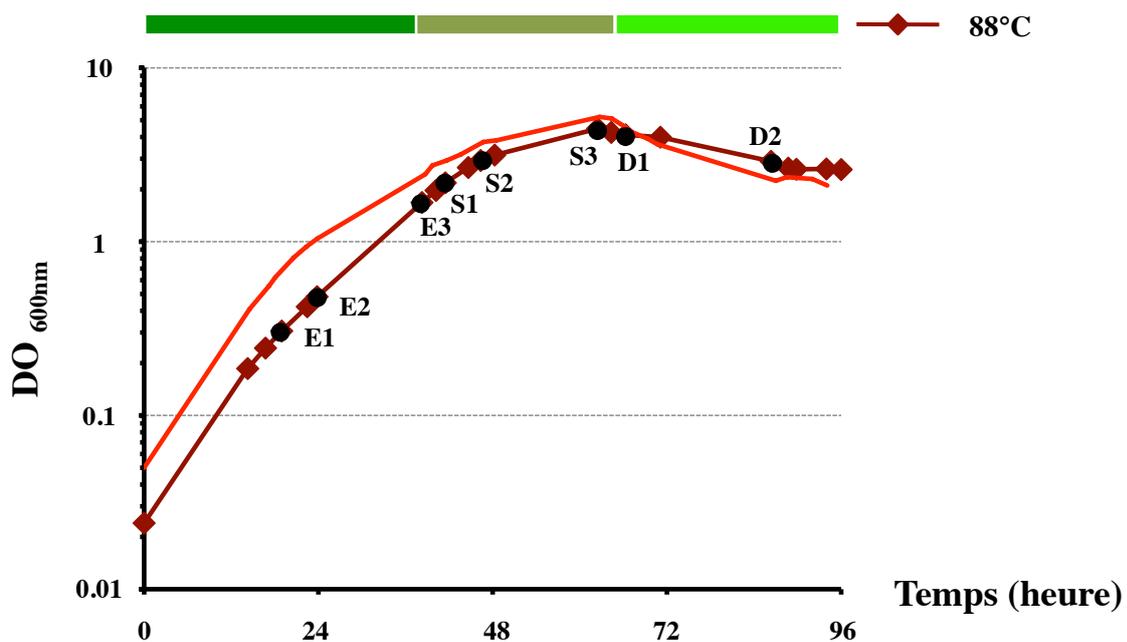


Figure 21- Courbe représentative de la croissance de *S. solfataricus* cultivé à 88°C.

Au cours de la croissance, trois phases principales sont identifiées : E pour phase exponentielle, S pour phase de ralentissement et D pour phase de déclin. La durée arbitraire de ces trois grandes phases est symbolisée par un rectangle de couleur vert au dessus de la courbe. La progression de la phase E puis S et D suit un dégradé de vert allant du plus foncé au plus clair. Au sein de ces trois phases, des subdivisions arbitraires sont indiquées : E1, S1 et D1 pour les phases précoces, E2 et S2 pour les phases intermédiaires, et E3, S3 et D2 pour les phases tardives à 88°C. La croissance est suivie par mesure de la DO à 600 nm, dont les valeurs sont reportées sur une échelle logarithmique. La courbe représentative de la croissance de *S. solfataricus* cultivé à 80°C (rouge) est associée pour faciliter la comparaison.

Régulation des reverse gyrases en fonction de la croissance de *S. solfataricus* à différentes températures.

L'étude des transcrits de *topR1* et de *topR2* a été réalisée à partir de cellules de *S. solfataricus* P2 maintenues en continu à 80°C ainsi qu'à 72°C (Garnier et Nadal, 2008). Dans cette étude, l'expression des gènes *topR1* et *topR2* en fonction des phases de croissance à 72°C est différente que celle obtenue à 80°C (Garnier et Nadal, 2008). Cette différence de réponse transcriptionnelle peut être liée à l'état physiologique des cellules dépendant de la température de croissance. En effet, du fait d'un taux de division plus lent à 72°C, les courbes de croissance à 80°C et à 72°C présentent des allures différentes, notamment par l'apparition à 72°C d'une phase stationnaire (Garnier et Nadal, 2008). Néanmoins, le niveau de transcrits de *topR1* et de *topR2* est toujours très faible voire indétectable en phase de déclin à 80°C comme à 72°C (Garnier et Nadal, 2008), phase à laquelle nous avons observé des différences entre le profil protéique de TopR1 et de TopR2 lorsque *S. solfataricus* est maintenue à 80°C. Au vue de ces résultats, il nous a semblé intéressant d'étudier les variations protéiques de TopR1 et de TopR2 à des températures proches de la température optimale de croissance comme 72°C et 88°C dans un premier temps puis à 60°C, température considérée comme la température limite de division des organismes hyperthermophiles.

Croissance de *S. solfataricus* à 88°C.

La courbe représentative de la croissance de *S. solfataricus* incubé en continu à 88°C est présentée en rouge foncé dans la Figure 21. D'un point de vue global cette courbe a la même allure que celle obtenue à 80°C (représentée en rouge sur la Figure 21) avec les trois grandes phases : exponentielle, ralentissement et déclin (Figure 21). Nous avons donc utilisé le même nombre de subdivisions arbitraires qu'à 80°C : E1, S1 et D1 pour les phases précoces, E2 et S2 pour les phases intermédiaires, et enfin E3, S3 et D2 pour les phases tardives. La phase exponentielle est une nouvelle fois la phase la plus courte : 6-7 heures à 88°C par rapport aux autres grandes phases (Figure 21). Le temps de génération optimal des cellules cultivées à 88°C (environ 6 heures) est légèrement plus élevé que celui des cellules cultivées à 80°C (environ 5 heures) (Figure 21). Au-delà de cette phase, le taux de division diminue au fur et à mesure que les cellules atteignent les phases tardives de la phase de ralentissement. De la même façon qu'à 80°C, une fois que la densité cellulaire maximale est atteinte (aux alentours de 4-5), les cellules entrent directement en phase de déclin.

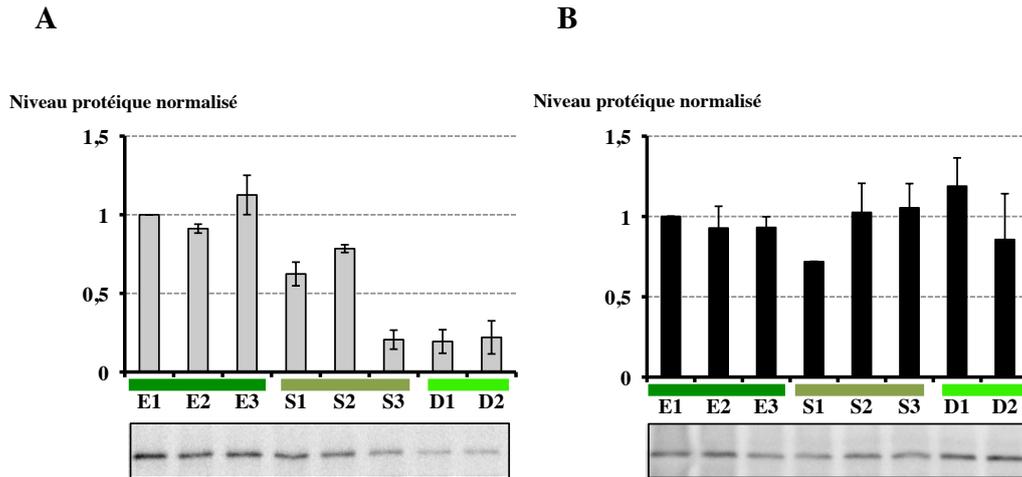


Figure 22- Variations quantitatives de TopR1 et de TopR2 en fonction de la phase de croissance de *S. solfataricus* cultivé à 88°C (extraits bruts).

Les cellules ont été prélevées aux différentes phases de croissance indiquées par la légende E1, E2, E3, S1, S2, S3, D1 et D2. Les analyses quantitatives du signal d'immuno-détection de TopR1 (A) et de TopR2 (B) sont présentées sous forme d'histogrammes et sont le résultat de deux expériences indépendantes. Les immunopreintes ayant servi à la quantification de TopR1 et de TopR2 dans les extraits bruts sont ajoutées en dessous des histogrammes correspondants. Une quantité protéique de 10 μg et de 50 μg ont été déposées pour la détection de TopR1 et TopR2 respectivement. Les quantités relatives de TopR1 et de TopR2 ont été pondérées par la quantité de protéines transférées sur la membrane de nitrocellulose et normalisées par rapport à la quantité de reverse gyrase correspondante détectée en E1.

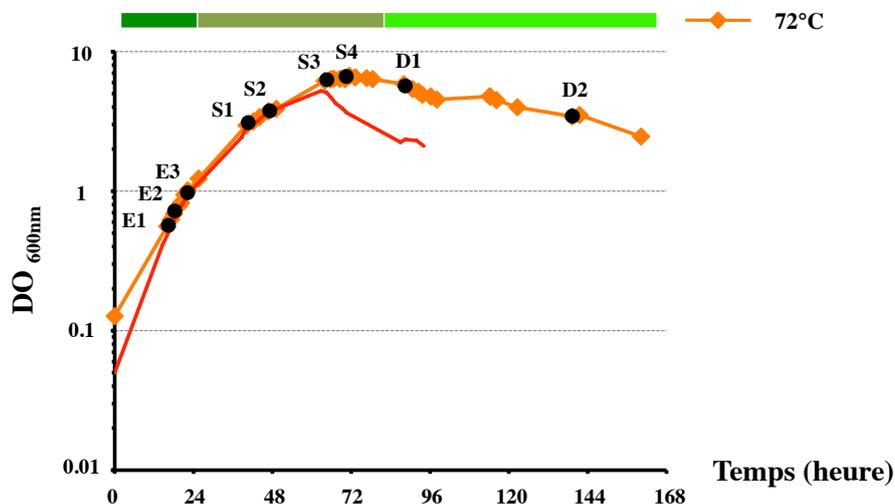


Figure 23- Courbe représentative de la croissance de *S. solfataricus* cultivé à 72°C.

Au cours de la croissance, trois phases principales sont identifiées : **E** pour phase exponentielle, **S** pour phase de ralentissement et **D** pour phase de déclin. La durée arbitraire de ces trois grandes phases est symbolisée par un rectangle de couleur vert au-dessus de la courbe. La progression de la phase **E** puis **S** et **D** suit un dégradé de vert allant du plus foncé au plus clair. Au sein de ces trois phases, des subdivisions arbitraires sont indiquées : E1, S1 et D1 pour les phases précoces, E2, S2 et S3 pour les phases intermédiaires, et E3, S4 et D2 pour les phases tardives à 72°C. La croissance est suivie par mesure de la DO à 600 nm, dont les valeurs sont reportées sur une échelle logarithmique. La courbe représentative de la croissance de *S. solfataricus* cultivé à 80°C (rouge) est associée pour faciliter la comparaison.

Variations quantitatives des reverse gyrases en fonction de la phase de croissance à 88°C.

La Figure 22 présente les résultats de la quantification des deux reverse gyrases dans les extraits protéiques totaux pour des cellules entretenues à 88°C.

Le niveau de TopR1 varie peu lorsque les cellules se divisent activement à 88°C (E1 à E3) puis il chute d'environ 50% en phase de ralentissement précoce S1 par rapport à la quantité présente en E3 (Figure 22A). Il ré-augmente en phase intermédiaire de ralentissement (S2) pour atteindre 75% du taux de TopR1 en E1. Puis, le niveau de TopR1 chute brutalement d'un facteur 4 entre la phase S2 et la phase S3 (Figure 22A). Ce niveau faible de TopR1 est maintenue jusqu'en phase de déclin tardif (Figure 22A). Le niveau de TopR2 est globalement constant tout au long de la croissance mise à part une légère diminution transitoire en phase de ralentissement précoce S1 (Figure 22B). Les profils protéiques de TopR1 et de TopR2 au cours de la croissance de *S. solfataricus* à 88°C sont globalement similaires à ceux observés lors d'une croissance à 80°C (Figure 22 et Figure 19). Notre contrôle de la coloration au rouge Ponceau (non montré) indique une nouvelle fois que les profils protéiques sont inchangés au cours des phases de croissance ce qui suggère que TopR1 serait dégradée spécifiquement dès la phase S3.

Que les cellules soient cultivées à 80°C ou à 88°C, la différence de régulation entre TopR1 et TopR2 au cours de la croissance de *S. solfataricus* est retrouvée, à savoir le maintien de TopR2 opposé à la disparition de TopR1 durant la phase de ralentissement tardive et la phase de déclin.

Croissance de *S. solfataricus* à 72°C.

La courbe représentative de la croissance de *S. solfataricus* incubé en continu à 72°C est présentée en orangé dans la Figure 23. Par comparaison à la courbe à 80°C (représentée en rouge sur la Figure 23), l'allure de la courbe est similaire et nous pouvons distinguer les trois grandes phases : exponentielle, ralentissement et déclin (Figure 23). En revanche, la durée de ces phases est différente, notamment pour la phase de ralentissement qui dénombre une subdivision arbitraire supplémentaire : E1, S1 et D1 pour les phases précoces, E2, S2 et S3 pour les phases intermédiaires, enfin E3, S4 et D3 pour les phases tardives à 72°C. La phase exponentielle est, certes la phase la plus courte par rapport aux autres grandes phases, mais elle est néanmoins plus longue à 72°C (9-10 heures) par rapport à celle à 80°C (Figure 23). Ceci est vraisemblablement dû au fait que les cellules se divisent avec un temps de génération

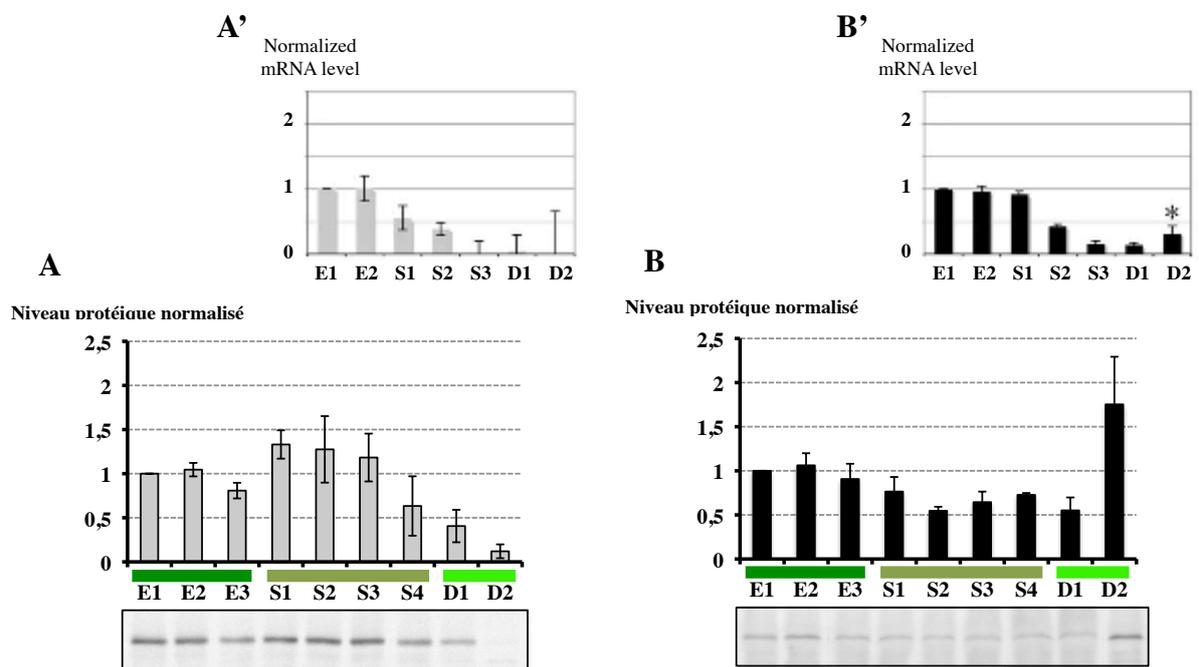


Figure 24- Variations quantitatives de TopR1 et de TopR2 en fonction de la phase de croissance de *S. solfataricus* cultivé à 72°C (extraits bruts).

Les cellules ont été prélevées aux différentes phases de croissance indiquées par la légende E1, E2, E3, S1, S2, S3, S4, D1 et D2. Les analyses quantitatives du signal d'immuno-détection de TopR1 (A) et de TopR2 (B) sont présentées sous forme d'histogrammes et sont le résultat de trois expériences indépendantes. Les immunopreintes ayant servi à la quantification de TopR1 et de TopR2 dans les extraits bruts sont ajoutées en dessous des histogrammes correspondants. Une quantité protéique de 10 μ g et de 50 μ g ont été déposées pour la détection de TopR1 et TopR2 respectivement. Les quantités relatives de TopR1 et de TopR2 ont été pondérées par la quantité de protéines transférées sur la membrane de nitrocellulose et normalisées par rapport à la quantité de reverse gyrase correspondante détectée en E1.

Les histogrammes correspondant aux variations transcriptionnelles des gènes *topR1* (A') et *topR2* (B') obtenues dans les mêmes conditions expérimentales sont montrés pour comparaison (issues de l'article publié par Garnier et Nadal, 2008).

optimal plus élevé à 72°C (environ 8 heures) que pour des cellules cultivées à 80°C (environ 5 heures) (Figure 23). Au-delà de cette phase, le taux de division diminue au fur et à mesure que les cellules atteignent les phases de ralentissement tardives. Il existe une différence majeure entre les courbes de croissance obtenues à 80°C et 88°C et celles obtenues à 72°C : la présence d'une phase stationnaire pour les cellules maintenues à 72°C (Figure 23 comparée aux Figures 21 et 18). En effet, un plateau est observé à partir de la phase de ralentissement intermédiaire S3 et dure environ 15 heures (Figure 23). La présence d'une phase stationnaire à 72°C s'accompagne d'une entrée en phase de déclin plus progressive (Figure 23).

Variations quantitatives des reverse gyrases en fonction de la phase de croissance à 72°C.

Les variations quantitatives de TopR1 en fonction de la croissance de *S. solfataricus* à 72°C sont relativement similaires à celles obtenues pour des cellules maintenues à 80°C. Toutefois la diminution transitoire de TopR1 ne se fait pas en S1 comme à 80°C mais en E3 à 72°C (Figure 24A comparée à la Figure 19A). De plus, TopR1 est à nouveau abondante pendant la majeure partie de la phase de ralentissement intermédiaire (S1-S3) à 72°C (Figure 24A) alors que pendant cette même phase à 80°C la quantité de TopR1 est plus fluctuante pour ne représenter que 40% en S3 (Figure 19A). La diminution progressive de TopR1 n'est observée qu'à partir de la phase S4 à 72°C, pour devenir indétectable en D2 (Figure 24A). Par contre, les variations de TopR2 à 72°C diffèrent de celles obtenues à 80°C, notamment au cours des phases intermédiaires et tardives de la phase de ralentissement (Figure 24B comparée à la Figure 19B). En effet, le niveau de TopR2 diminue légèrement en S2 et ce niveau reste constant jusqu'en D1 (Figure 24B). Contrairement à 80°C où TopR2 est présente en phase de déclin (D1-D2), TopR2 n'est abondante à 72°C qu'en déclin tardif (D2) (Figure 24B). Comme pour les cultures de *S. solfataricus* à 80°C, TopR1 et TopR2 sont régulées de manière différente en fonction de la phase de croissance à 72°C : TopR1 est absente en phase de déclin alors que TopR2 est présente en abondance.

Après avoir testé deux températures encadrant 80°C, nous nous sommes placés à la température considérée comme étant la « limite de division des hyperthermophiles » (Stetter *et al.*, 1990). Nous pensions que cette température « basse » pour *S. solfataricus* pourrait impacter fortement le contenu en topoisomérases.

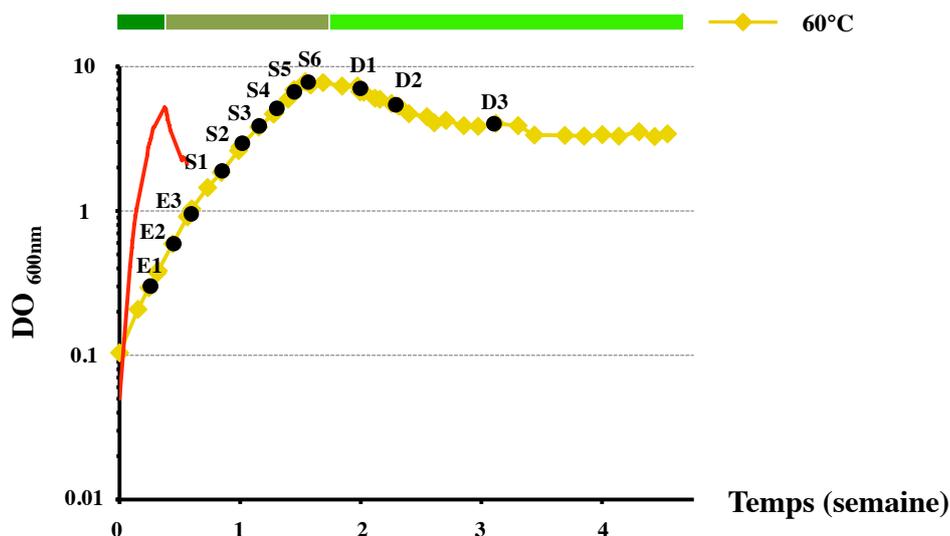


Figure 25- Courbe représentative de la croissance de *Sulfolobus solfataricus* cultivé à 60°C.

Au cours de la croissance, trois phases principales sont identifiées : E pour phase exponentielle, S pour phase stationnaire et D pour phase de déclin. La durée arbitraire de ces trois grandes phases est symbolisée par un rectangle de couleur vert au dessus de la courbe. La progression de la phase E puis S et D suit un dégradé de vert allant du plus foncé au plus clair. Au sein de ces trois phases, des subdivisions arbitraires sont indiquées : E1, S1 et D1 pour les phases précoces, E2, S2, S3, S4, S5 et D2 pour les phases intermédiaires, et E3, S6 et D3 pour les phases tardives à 60°C. La croissance est suivie par mesure de la DO à 600 nm, dont les valeurs sont reportées sur une échelle logarithmique. La courbe représentative de la croissance de *S. solfataricus* cultivé à 80°C (rouge) est associée à chacune des courbes pour faciliter la comparaison.

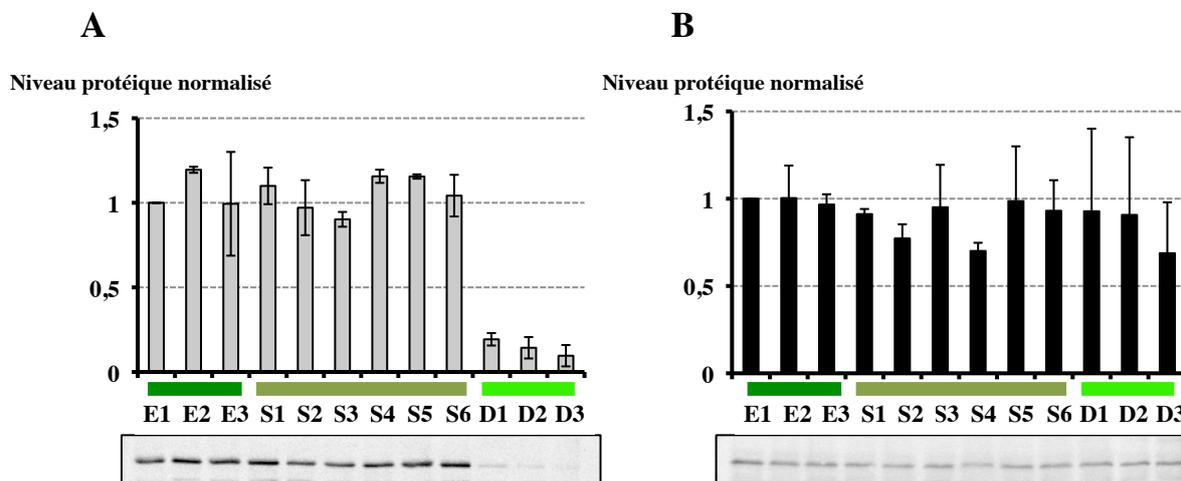


Figure 26- Variations quantitatives de TopR1 et de TopR2 en fonction de la phase de croissance de *S. solfataricus* cultivé à 60°C (extraits bruts).

Les cellules ont été prélevées à différentes phases de croissance indiquées par la légende E1, E2, S1, S2, S3, S4, D1 et D2. Les analyses quantitatives du signal d'immuno-détection de TopR1 (A) et de TopR2 (B) sont présentées sous forme d'histogrammes et sont le résultat de trois expériences indépendantes. Les immuno-empresintes ayant servi à la quantification de TopR1 et de TopR2 dans les extraits bruts sont ajoutées en dessous des histogrammes correspondants. Une quantité protéique de 10 µg et de 50 µg ont été déposées pour la détection de TopR1 et TopR2 respectivement. Les quantités relatives de TopR1 et de TopR2 ont été pondérées par la quantité de protéines transférées sur la membrane de nitrocellulose et normalisées par rapport à la quantité de reverse gyrase correspondante détectée en E1.

Croissance de *S. solfataricus* à 60°C.

Bien que 60°C ait été rapportée comme température limite pour la division des hyperthermophiles, nous montrons que la croissance de *S. solfataricus* est tout à fait possible à cette température, dans nos conditions expérimentales. Une courbe représentative de la croissance de *S. solfataricus* à 60°C est présentée en jaune dans la Figure 25. Elle peut être à nouveau divisée en trois phases principales : exponentielle, ralentissement et déclin respectivement notées E, S et D. Les phases principales peuvent aussi être subdivisées arbitrairement en phases dites précoces (E1, S1 et D1), intermédiaires (S2, S3, S4, S5 et D2) et tardives (E2, S6, et D3). Nous pouvons constater d'emblée que la phase de ralentissement est bien plus longue à 60°C qu'elle ne l'est à 80°C (Figure 25). Les cellules adaptées à 60°C ont un temps de génération optimal d'environ 20 heures et, comme pour les trois autres températures présentées précédemment, ce temps de division augmente au fur et à mesure que les cellules entrent en phase de ralentissement (Figure 25). La phase exponentielle dure entre 4 et 6 jours et la phase de ralentissement est d'environ 6 à 7 jours ! Lorsque la densité optique maximale est atteinte, aux alentours de 7-8, les cellules entrent tout d'abord en phase stationnaire sur une durée d'environ 3-4 jours. Suite à cette phase stationnaire, les cellules entrent très progressivement en phase de déclin. La phase de déclin est très longue (environ une dizaine de jours) et se caractérise au-delà par un plateau pendant près de deux semaines voire plus. Finalement, l'allure de cette courbe est proche de celle présentée pour la croissance de *S. solfataricus* à 80°C mais sur une échelle de temps au moins multipliée par 8 (Figure 25 comparée à la Figure 18).

Variations quantitatives des reverse gyrases en fonction de la phase de croissance à 60°C.

La figure 26 montre les résultats des quantifications des signaux des deux reverse gyrases pour trois cinétiques indépendantes. Le niveau de TopR1 reste globalement stable de la phase exponentielle précoce (E1) à la phase stationnaire tardive (S6) puis le niveau de TopR1 chute brutalement entre les phases S6 et D1 pour être presque indétectable en phase de déclin tardif (D3) (Figure 26A). La quantité de TopR2 est également relativement stable quelle que soit la phase de croissance (de la phase exponentielle E1 à la phase de déclin tardive D3) (Figure 26B). Néanmoins, nous observons deux légères diminutions transitoires de TopR2 aux phases S2 et S4.

Dans cette étude menée à 60°C, nous observons que TopR1 et TopR2 sont à nouveau régulées de manières différentes. TopR1 est plus abondante lorsque les cellules se divisent et semble être spécifiquement dégradée en phase de déclin alors que TopR2 reste une nouvelle fois présente en quantité relativement abondante tout au long des différentes phases et notamment lorsque les cellules sont en phase de déclin.

Discussion

Dans les conditions de croissance testées, *S. solfataricus* est capable de croître sur une large gamme de température qui s'étend de 60°C à 88°C. Cette gamme est en accord avec celle proposée par Brock et collaborateurs en 1972 pour les espèces appartenant au genre *Sulfolobus* (Brock *et al.*, 1972). Bien que 60°C soit rapportée par la littérature comme étant la température limite de division des organismes hyperthermophiles (Stetter *et al.*, 1990), nous montrons que *S. solfataricus* croît relativement bien à 60°C avec un temps de génération optimal d'environ 20 heures.

Nos mesures de densité optique mettent en évidence que chaque température de croissance se caractérise par une densité optique maximale et que plus la température augmente, plus cette densité optique diminue en conséquence. En effet, à 60°C la densité optique maximale est entre 7-8, à 72°C elle est comprise entre 6-7, à 80°C elle est de l'ordre de 5-6 et enfin à 88°C elle n'est plus qu'entre 4-5. Ces différences peuvent être associées à d'une part la consommation des nutriments par les Sulfolobales, d'autre part à l'impact direct de la température sur les composés nutritifs mais aussi à un rejet plus important de déchets. De plus, les cellules entrent très rapidement en phase de déclin à hautes températures (80°C et 88°C) alors qu'à plus basses températures (60°C et 72°C), les cellules entrent plus progressivement en phase de déclin par le biais d'une phase stationnaire. Cette dernière est d'autant plus longue que la température testée est basse. En effet, à 72°C elle est d'environ 15 heures alors qu'à 60°C elle dure entre 3 et 4 jours !

Au cours de cette étude, l'évolution quantitative de chacune des deux reverse gyrases a été suivie en fonction de l'état physiologique du *crenarchaeon S. solfataricus*. Toutefois, nous savons que les trois ADN topoisomérases IA (TopR1 et TopR2, mais également TopA) sont exprimées lorsque *S. solfataricus* se divisent plus ou moins activement à 80°C, l'expression du gène *topA* étant beaucoup plus faible que l'expression des deux gènes *topR1* et *topR2* (Garnier communication personnelle ; Garnier et Nadal, 2008). Lors de nos travaux présentés dans cette première partie, nous n'avons pas réussi à détecter TopA. Ce résultat suggère qu'au cours des phases de croissance, TopA est soit non traduite, soit présente en quantité trop faible pour être détectée dans nos conditions expérimentales. Nous privilégions la seconde possibilité car dans une étude menée chez une autre Sulfolobale, de très grandes quantités de protéines totales (200µg) ont dû être utilisées pour pouvoir la visualiser (Li *et al.*, 2011). Cela sous-entend que TopA doit jouer un rôle dans d'autres conditions physiologiques dans lesquelles son expression et/ou sa synthèse protéique serait augmentée. Ainsi, il sera

intéressant de trouver ces conditions expérimentales particulières afin d'en apprendre plus quant au rôle de TopA.

Un des résultats les plus surprenants de cette étude est la différence de profil d'expression observée entre TopR1 et TopR2, à partir de la phase de ralentissement tardive (ou phase stationnaire) jusqu'en phase de déclin et ce quelle que soit température testée (88°C, 80°C, 72°C et 60°C). En effet, alors que le niveau de TopR1 diminue systématiquement pendant la phase de déclin, phase au cours de laquelle les cellules cessent de se diviser, le niveau de TopR2 reste globalement constant tout au long de la croissance. Ce résultat est surprenant car lors de l'étude des transcrits de chacun des gènes *topR1* et *topR2*, il a été montré que leurs profils transcriptionnels étaient similaires pour chacune des deux températures testées (80°C et 72°C) (Garnier et Nadal, 2008). Le profil quantitatif de la protéine TopR1 obtenu à 80°C suit en tout point l'évolution des transcrits correspondants, ce qui suggère que la protéine TopR1 soit régulée essentiellement de manière transcriptionnelle (Figure 19A et 19A'). Cette interprétation ne semble pourtant pas s'appliquer totalement pour les cellules maintenues à 72°C puisqu'une augmentation du niveau protéique de TopR1 est observée en phase S1 alors que le niveau des transcrits *topR1* diminue à cette même phase. L'explication possible serait que le pool de TopR1 produit en phase E3 ait un « turn over » plus lent à 72°C qu'à 80°C ce qui le stabiliserait pour la phase suivante. La transcription de *topR1* n'étant pas nulle en phase S1, la synthèse protéique qui en résulte s'ajouterait au pool de TopR1 déjà présent. Au cours des phases stationnaires observées à 72°C et à 60°C, les machineries impliquées dans le métabolisme de l'ADN sont encore actives et génèrent des contraintes topologiques qu'il est nécessaire de contrôler. Dans l'hypothèse de l'intervention de TopR1 dans la résolution de ces contraintes, il apparaît important de maintenir une activité suffisante de TopR1. Etant donné que son activité de surenroulement positif est très faible à basse température (60°C-70°C) (Bizard *et al.*, 2011), cette activité réduite serait compensée par une stabilité accrue de cette reverse gyrase à basse température, au moins tant que les cellules ont un métabolisme actif de l'ADN. En effet, une fois que les cellules cessent de se diviser, le niveau de TopR1 diminue.

En revanche, nous avons vu que la protéine TopR2 est présente tout au long de la croissance y compris en phase de déclin où les transcrits *topR2* sont absents (Figure 19B et 19B'). Sa régulation ne se fait donc pas exclusivement à l'échelle transcriptionnelle. Lorsque nous avons testé la spécificité des anticorps primaires, nous avons pu observer que la masse moléculaire apparente de la protéine recombinante TopR2 était inférieure à celle de la

protéine TopR2 contenue dans des extraits bruts de *S. solfataricus* (Figure 3 page 259). L'hypothèse la plus simple pour expliquer cette différence de masse moléculaire est de considérer que la protéine TopR2 exprimée chez *S. solfataricus* subit une (des) modification(s) post-traductionnelle(s) qui ne serait(ent) pas retrouvée(s) lorsque celle-ci est exprimée chez *E. coli*. A ce jour, aucune information n'est parue concernant les modifications post-traductionnelles des reverse gyrases, néanmoins, une modification post-traductionnelle de type phosphorylation a été mise en évidence sur l'ADN topoisomérase de type I du tabac ainsi que sur celle du pois (Mudgil *et al.*, 2002 ; Tuteja *et al.*, 2003). Cette modification post-traductionnelle ne module en rien l'activité de la topoisomérase du tabac (Mudgil *et al.*, 2002). En revanche, la phosphorylation post-traductionnelle serait impliquée dans un mécanisme de régulation de l'activité de l'ADN topoisomérase du pois (Tuteja *et al.*, 2003). Ainsi, l'hypothèse d'une modification post-traductionnelle de type phosphorylation pourrait être impliquée directement dans l'augmentation de la stabilité de TopR2 ou indirectement en inhibant le processus de dégradation de TopR2 lors de la transition entre la phase stationnaire S3 et la phase de déclin à 80°C par exemple.

La présence d'un taux constant de TopR2 quelle que soit la phase de croissance, soulève la question du mode de régulation de cette reverse gyrase tout au long de la croissance ou, en d'autres termes, suivant que les cellules se divisent ou pas. Une étude menée à l'échelle transcriptomique chez *S. acidocaldarius* montre que le taux de transcrits de *topR2* augmente transitoirement lors de la transition G1/S du cycle cellulaire (Lundgren et Bernander, 2007). Bien que cette étude ne donne aucune information quant au devenir de ces transcrits, nous pouvons imaginer qu'ils soient traduits. Ainsi, cela signifierait que TopR2 soit impliquée dans le cycle cellulaire lors de la réplication. D'après nos résultats nous constatons au moins deux comportements de TopR2. Dans un premier temps, le profil protéique de TopR2 suit globalement celui des transcrits jusqu'en phase S2 à 80°C. Il est alors possible que la présence de TopR2 à ces phases puisse être liée à la réplication. Dans un second temps, la protéine TopR2 est maintenue lorsque les cellules cessent de se diviser, ce qui ne semble pas aller dans le sens d'une implication dans la réplication *stricto sensu* ; mais elle peut être impliquée dans d'autres processus telle que la résolution de jonction à quatre branches comme ce que l'on retrouve dans les cas de réversion de fourche de réplication ou de jonction de Holliday.

S'il est encore difficile d'attribuer un rôle précis à chacune des deux reverse gyrases, les résultats obtenus dans cette partie montrent une régulation différente entre TopR1 et TopR2. Il semble que TopR1 puisse être intimement liée au fait que les cellules se divisent plus ou moins activement ; TopR2 serait quant à elle plus impliquée dans la résolution de structures particulières de l'ADN formées notamment au cours de la réplication/réparation.

II- Les ADN topoisomérases dans la régulation homéostatique du surenroulement de l'ADN chez *S. solfataricus*

Dans le système bactérien la prise en charge des variations de surenroulement est sous le contrôle du couple d'ADN topoisomérases antagonistes : l'ADN topoisomérase I (la protéine ω) et l'ADN gyrase (Menzel et Gellert, 1983 ; Tse-Dinh, 1985). Il a aussi été montré que suite à une variation de température, la topologie de l'ADN et notamment le nombre de liens topologiques changeaient, indiquant l'implication des ADN topoisomérases dans cette réponse (Goldstein et Drlica, 1984). Néanmoins, l'intervention des ADN topoisomérases dans la réponse à une variation de température n'est pas exclusive. En effet, la réponse mécanique de l'ADN vis-à-vis de la température fut mise en évidence aussi bien à basse qu'à haute température (Depew et Wang, 1975 ; Duguet, 1993).

Les archées hyperthermophiles se caractérisent entre-autres par une topologie unique de leur ADN comme en témoignent les études de topologie menées sur des ADN plasmidiques qui sont soit dans un état relâché soit surenroulé positivement (pour une revue Forterre *et al.*, 1996 ; López-García et Forterre, 1997). Des études visant à suivre les variations topologiques de plasmides isolés d'archées hyperthermophiles après un choc thermique montrent d'ailleurs clairement une réponse en deux temps (López-García et Forterre, 1997 ; López-García et Forterre, 1999). Dans un premier temps la densité de surenroulement est immédiatement modifiée suite aux variations de la température puis, dans un second temps, cette densité est ré-ajustée pour atteindre un état compatible avec l'activité cellulaire à la nouvelle température. Ce résultat suggère qu'un mécanisme de contrôle du surenroulement de l'ADN est mis en place afin d'obtenir un niveau de surenroulement en adéquation avec l'activité cellulaire à la nouvelle température (López-García et Forterre, 1999). La reverse gyrase ainsi que l'ADN topoisomérase VI sont des enzymes qui présentent des activités antagonistes. Alors que la reverse gyrase introduit des supertours positifs dans l'ADN (Kikuchi et Asai, 1984 ; Mirambeau *et al.*, 1984), l'ADN topoisomérase VI est la seule topoisomérase de ces organismes capable de relâcher les supertours positifs (Bergerat *et al.*, 1994). Chez le *crenarchaeon Sulfolobus*, l'hypothèse de l'intervention du couple d'ADN topoisomérases, reverse gyrase et ADN topoisomérase VI, en réponse aux stress thermiques a été émise (López-García et Forterre, 1999). Bien qu'aucune régulation de la quantité de ces enzymes n'ait lieu, les auteurs suggèrent que ces ADN topoisomérases

soient impliquées (López-García et Forterre, 1999). Cependant, il a été montré chez *S. solfataricus* que l'expression du gène *topR1* répond aux variations de températures alors que le gène *topR2* est constitutivement exprimé (Garnier et Nadal, 2008). Il semble donc que TopR1 soit la reverse gyrase impliquée dans le contrôle du surenroulement de l'ADN de *S. solfataricus*.

Afin d'obtenir clairement une réponse, nous avons entrepris de suivre les variations quantitatives de TopR1 et de TopR2 de *S. solfataricus* à la suite de variations de températures. Ces transferts réciproques de températures ont pour but d'amplifier les variations topologiques et donc de mettre en évidence la régulation homéostatique du surenroulement de l'ADN. Grâce à la collaboration avec Patrick Forterre, nous possédons des anticorps spécifiquement dirigés contre les deux sous-unités de l'ADN topoisomérase VI de *S. shibatae*, ce qui nous permet d'étudier de la même façon les variations protéiques de ces deux sous-unités et d'estimer pour la première fois le nombre d'ADN topoisomérase VI par cellule.

Quelles que soient les variations de températures, les nombres de TopR2 et de Topoisomérase VI par cellule restent constants. *A contrario*, le nombre de TopR1 par cellule varie en réponse à ces transferts ce qui indique que cette reverse gyrase est le régulateur du contrôle homéostatique du surenroulement de l'ADN chez *S. solfataricus*. Les résultats obtenus à l'échelle protéique nous permettent de proposer un modèle de régulation qui explique nos propres résultats tout en rendant compte également des anciennes études de mesure des variations du nombre de liens topologiques des plasmides isolés de Sulfolobales (López-García et Forterre, 1999). Notre modèle prend en compte à la fois les variations des activités *in vitro* des deux reverse gyrases et de la topoisomérase VI en fonction de la température ainsi que de leurs niveaux protéiques respectifs.

ARTICLE 1 :

Homeostatic regulation of DNA topology in the crenarchaeon
Sulfolobus solfataricus in response to temperature shifts

Couturier M., Garnier F., Gadelle D., Forterre P., Nadal M.

Article en préparation (pour soumission à *Molecular Microbiology*)

Introduction

The family of DNA topoisomerases is a class of enzymes present in all domains of life. These enzymes control the topological state of the DNA by catalysing a trans-esterification reaction. Based on the trans-esterification, it is possible to distinguish two types of topoisomerases. Topoisomerases which transiently break one strand belong to the type I DNA topoisomerases whereas those which transiently break both strands of the double helix represent the type II DNA topoisomerases (Wang, 2002).

Manipulations of the double helix during many cellular processes such as replication, and transcription, cause a change of DNA topology, which results in local torsional stress. For example, when the transcription apparatus assembles on the double helix to form an open complex and then moves along DNA, transient overwinding or positive supercoiling is created downstream while transient underwinding or negative supercoiling is occurring upstream. Local torsional stresses have to be resolved because they have an impact on the dynamic of DNA: positive supercoiling constrains the DNA whereas negative supercoiling favors strand separation. DNA topoisomerases are needed to allow these processes to progress without everything getting tangled by eliminating these topological stresses. Since high temperatures favor the DNA denaturation, the control of the opening of the double helix and more generally the control of DNA topology is more crucial for thermophilic organisms. If we look at hyperthermophiles, all possess at least one gene encoding a particular DNA topoisomerase IA: the reverse gyrase (Forterre, 2002 ; Brochier-Armanet and Forterre, 2006).

Reverse gyrase is responsible for the introduction of positive supercoils which constrain the double helix (Kikuchi and Asai, 1984 ; Mirambeau *et al.*, 1984). So, according to its repartition among thermophilic and hyperthermophilic organisms from *Archaea* and *Bacteria*, and the fact that the DNA denaturation could be avoided by its singular activity, it is reasonable to hypothesize that reverse gyrase is closely linked to hyperthermophilic life, but its precise role is still unclear (for a review Nadal, 2007 ; Perugino *et al.*, 2009).

Beside reverse gyrase, hyperthermophilic organisms exhibit an other topoisomerase IA TopA (Dai *et al.*, 2003) and, at least, a type II DNA topoisomerase which is able to relax positively supercoiled DNA leading to an equilibrium between two antagonist activities (Bergerat *et al.*, 1994). The presence in the same microorganism of the reverse gyrase and the topoisomerase VI reminds the opposite actions in *E. coli* of the gyrase and the ω protein,

leading to a chromosome with an intermediate DNA superhelical density (Menzel and Gellert, 1983 ; Tse-Dinh, 1985).

The crenarchaeon hyperthermophile *S. solfataricus* possesses two copies of reverse gyrase encoding gene, *topR1* and *topR2* (She *et al.*, 2001). It is noteworthy that this duplication is conserved in most of the *Crenarchaeota* (Brochier-Armanet and Forterre, 2006) and it has been recently reported that the two genes are essential (Zhang *et al.*, 2013). However, this conserved duplication raises two following questions: do they have a functional specialization and are they involved in different cellular processes? By consequence, elucidate the precise role of the two reverse gyrases seems to be crucial. First, it was reported that *topR2* is regulated during the cell cycle since its transcript is induced at the G1/S transition (Lundgren and Bernander, 2007). Moreover, we reported that the two genes are differently regulated both during growth and after temperature shift (Garnier and Nadal, 2008). Finally, we observed that the two recombinant reverse gyrases exhibit different enzymatic behavior (Bizard *et al.*, 2011). With the previous data, the incredible high processivity of TopR2 prevent to consider that this reverse gyrase could have a regulatory role on the superhelical density of the DNA. On the contrary due to the specific regulation of the *topR1* gene expression after a temperature shift, it was strongly suggested that TopR1 could play a key role in the homeostatic control of DNA supercoiling. In the present work, we precisely quantified the variations of the two reverse gyrases TopR1 and TopR2 and of the two subunits A and B from the topoisomerase VI by immunodetection in response to a topological perturbation of the cellular DNA following a thermal stress. From the two reverse gyrases present in *S. solfataricus*, we clearly evidenced for the first time the specific involvement of TopR1 in the fine control of the DNA supercoiling by homeostasis in one member of the *Archaea* domain.

Results

Effect of Temperature Shifts on S. solfataricus growth.

According to the work done on *Escherichia coli*, it is well known that the homeostatic control of the DNA supercoiling takes place rapidly in cells to permit their development under new environmental conditions (Menzel and Gellert, 1983 ; Tse-Dinh, 1985). In this study, *S. solfataricus* cells are submitted to temperature up- and down- shifts to trigger topological changes and possibly the resulting homeostatic control of the DNA supercoiling. The choice

of temperatures for shift experiments takes into account the fact that cells must be able to grow continuously at these temperatures. In addition, we decided to reproduce reciprocal shifts to visualize potential mirror answers. As TopR1 exhibits much more activity at high temperature, we choose 80°C and 88°C rather than 72°C which was the temperature used in the transcriptional study (Garnier and Nadal, 2008). To control the growth of *S. solfataricus* in response of temperature shifts, the OD_{600nm} was monitored on a short time scale (6 hours) for each culture.

We transferred three independent exponentially growing culture of *S. solfataricus* from 80°C to 88°C or from 88°C to 80°C and we collected samples for a period of 6 hours. Cells cultivated either at 80°C or at 88°C and maintained at these two temperatures during the entire time of the experiment represent control cells. For each temperature shift, representative OD measurements are reported in Figure 1. Actively dividing cells either at 80°C or at 88°C have similar growth rates. Indeed, 80°C or 88°C exponentially growing cells exhibit a doubling time of around 4 hours and 4.5 hours respectively until they reach OD around 0.6. After that OD and during 6 hours after the shift, they continue to grow with a slightly longer doubling time: roughly 6 hours and 5.6 hours respectively. In parallel, an aliquot of culture is transferred either from 80°C to 88°C or from 88°C to 80°C (Figure 1 A and B). Whatever the temperature shift, transferred cells quickly adopt the typical doubling time of control cells. Indeed, doubling time of transferred cells from 80°C to 88°C and from 88°C to 80°C are about 5.4 hours and 6 hours respectively (Figure 1A and 1B compared with doubling time of 88°C or 80°C control cells respectively). Even if slight variations of the growth rate are observed between control cells and transferred cells whatever the starting temperature, a variation of 8°C higher than 80°C does not have a real impact on the growth of *S. solfataricus* in our culture conditions on short scale (Figure 1). The explanation is because the growth rates at 80°C and 88°C are very close during the exponential phase (Figure 1). To be sure that transferred cells exhibit a typical growth curve either at 80°C or at 88°C, the OD measurements were pursued 28 hours after the up- or the down-shift (supporting information 1). The same maximal OD is reached by cells maintained or transferred at 80°C and this maxima (around 6) is higher than these observed for cells maintained or transferred at 88°C (around 4) (supporting information 1).

Effect of Temperature Shifts on DNA topoisomerase protein level.

According to the biochemical characterisation of purified recombinant TopR1 and TopR2, it appears that they do not exhibit the same properties in regards to the temperature

(Bizard *et al.*, 2011). Indeed, while TopR1 is active in a wide range of temperatures between 60°C and 90°C, TopR2 exhibits maximal activity at 70°C and has a very low activity above 80°C (Bizard *et al.*, 2011). In addition, TopR1 is a distributive enzyme meaning that it progressively introduces positive supercoils into DNA whereas TopR2 is a processive one. Based on these results it was proposed that, among the two reverse gyrases encoded by *S. solfataricus*, only TopR1 is an ideal candidate for a homeostatic regulation of the superhelical density of the DNA as a function of temperature. To verify this hypothesis, specific antibodies were used to follow protein levels of these two reverse gyrases. Topoisomerase VI is the only type II DNA topoisomerase in *S. solfataricus* (She *et al.*, 2001) and is the only one able to relax positively supercoiled DNA (Bergerat *et al.*, 1994). So it is tempting to hypothesize that this DNA topoisomerase is involved, in concert with TopR1 and/or TopR2, in the control of DNA supercoiling in *S. solfataricus*. Topoisomerase VI is composed by two subunits (A and B) to form a heterotetramer (Bergerat *et al.*, 1994 ; Buhler *et al.*, 1998). Antibodies specifically raised against the two subunits of topoisomerase VI of *S. shibatae* were used to detect these two subunits in *S. solfataricus* crude extracts. As the signal obtained for each subunit was correct, we could estimate the number of each subunit of topoisomerase VI per cell for cells growing exponentially either at 80°C or at 88°C. In the same way that it was done in a previous study for TopR1 and TopR2 of *S. solfataricus* (Couturier *et al.*, *submitted*), calibration curves of the topoisomerase VI A and B subunits are presented in supporting information 2. In 80°C exponentially dividing cells, the number of topoisomerase VI A and B subunits per cell are extremely higher than those of the two reverse gyrases: 16323 ± 1573 and 1359 ± 410 respectively (Table 1). Surprisingly, the number of A subunit is twelve times higher than the number of B subunit. As previously described (Couturier *et al.*, *submitted*), the two reverse gyrases of *S. solfataricus* are present at a low level in 80°C exponentially dividing cells: about 50 TopR1 per cell ± 7 and 125 TopR2 per cell ± 11 (Table 1). In 88°C actively dividing cells, the number of TopR1 per cell is twice as less important than at 80°C (around 28 TopR1 per cell) while the number of TopR2 per cell and those of topoisomerase VI A and B subunits are in the same order than those estimated in 80°C actively diving cells (Table 1).

Nevertheless, it is also possible that proteins could be regulated at the protein level *via* a sub-cellular partitioning. To check whether the two reverse gyrases and one or two subunit(s) of topoisomerase VI exhibit a different sub-cellular partitioning in relation to the temperature growth, their protein levels were qualitatively determined in soluble protein and

chromosomal DNA enriched fractions in control cells cultivated at 80°C or 88°C (Figure 2). Whatever the temperature tested, the two reverse gyrases are mainly found in the soluble fraction (Figure 2A and 2B, lanes 1 and 2). On the contrary, if both subunits of topoisomerase VI are rather found to be associated with the chromosomal DNA enriched fraction (Figure 2A and 2B, lanes 3 and 4), it remains a difference between both topoisomerase VI subunits. Indeed, if the soluble protein fraction contains almost no TopoVIB subunit, it exhibits a significant amount of TopoVIA both in 80°C and 88°C actively dividing cells (Figure 2A and 2B lanes 4 compared to Figure 2A and 2B lanes 3).

To check the involvement of each protein in the homeostatic control of DNA supercoiling in *S. solfataricus*, cell samples from control and transferred cells were collected at different time points after the shift and the content of both reverse gyrases and topoisomerase VI A and B subunits were analyzed by immuno-detection. As a functional topoisomerase VI is obtained when the number of each subunit is stoichiometric (Buhler *et al.*, 1998) and because the number of the B subunit is lower than the A subunit, we only focused on the B subunit to follow the number of topoisomerase VI per cell. Quantitative variations of the two reverse gyrases and the TopoVIB subunit in response to thermal shifts and in control cells are represented by histograms in Figures 3 and 4 respectively. In upshifted cells (from 80°C to 88°C), the number of TopR1 per cell progressively decreases until reaching a minimum around 20 TopR1 per cell at the time points 1 and 2 hours after the transfer (Figure 3A). This number remains roughly constant until the end of the experiment (Figure 3A). Inversely, in downshifted cells (from 88°C to 80°C), the number of TopR1 per cell progressively and transiently increases (Figure 3A). The maximal number is around 45 TopR1 per cell after 2 hours at the new temperature (80°C). By comparison with control cells, these variations of TopR1 seem to be correlated with temperature shifts (Figure 3A compared to Figure 3C). The number of TopR2 per cell remains roughly constant during the 6 hours of the experiment whatever the temperature (Figure 3B). These results are also observed in control cells (Figure 3D). For TopoVIB subunit, its number per cell remains constant whatever the temperature shift experiment (Figure 4A and 4B for shift and control experiment respectively).

To sum up, TopR1 is the only one reverse gyrase of *S. solfataricus* for which the protein level is modulated in response to temperature shifts (Figure 3A compared to Figure 3B). These results are in agreement with the transcriptional study previously performed for *topR1* and

topR2 genes during a temperature shift from 80°C to 72°C and reciprocally (Garnier and Nadal, 2008). As the number of TopoVIB subunit per cell remains constant whatever the temperature and according to the postulate that the number of native topoisomerase VI per cell is function of this number, it is possible to hypothesize that the protein level of topoisomerase VI remains constant.

Activity of the recombinant Topoisomerase VI at high temperature.

Another way to regulate a protein is to modulate its intrinsic activity. DNA topoisomerase VI is the only enzyme able to relax positively supercoiled DNA in *S. solfataricus* (Bergerat *et al.*, 1994 ; She *et al.*, 2001). According to our hypothesis, this enzyme should be involved in the homeostatic control of DNA supercoiling in *S. solfataricus*. Interestingly, the protein level of DNA topoisomerase VI remains constant whatever the direction of the temperature shift (Figure 4A). In terms of activity, by using the DNA relaxation assay, a previous report clearly showed that the recombinant topoisomerase VI of *S. shibatae* is not active at a temperature below 60°C (Buhler *et al.*, 1998). By contrast, the upper temperature at which the topoisomerase VI is active was not clearly established because the relaxation assay poorly distinguished the negatively supercoiled substrate and the DNA relaxed at high temperature (Buhler *et al.*, 1998). Consequently, we checked the activity of topoisomerase VI at high temperature by using the DNA decatenation assay (Figure 5).

We observed that topoisomerase VI is able to decatenate efficiently the kDNA until 85°C but not at a higher temperature since a very faint activity is observed at 90°C and 95°C (compared Figure 5, lane 6 with lanes 7 and 8). Interestingly, decatenation assay allows us to visualize not only the decatenation of DNA minicircles per se but also the relaxation reaction. We observed that, when the incubation temperature increases, the relaxed DNA minicircles migrate more and more closely to the negatively supercoiled substrate (see figure 5, lanes 3 to 7). By comparison with the TopR1 and TopR2 activities (Bizard *et al.*, 2011), we conclude that the activity of topoisomerase VI exhibits an optimal range temperature higher than TopR2 but lower than TopR1. Nevertheless, this enzyme is active in temperature range corresponding to the temperature at which the *Sulfolobus*' cells are able to divide. Currently, at temperature higher than 85°C, TopR1 is the only efficient topoisomerase in *Sulfolobus* and in these conditions it is able to introduce a very high positive supercoiling (this study and Bizard *et al.*, 2011).

Discussion

The present study focuses on the regulation of DNA topoisomerases of the hyperthermophilic crenarchaeon *S. solfataricus* in response to temperature variations. To do this, we quantified all the DNA topoisomerases of *S. solfataricus* in the different conditions. The genome of *S. solfataricus* exhibits three genes encoding topoisomerase IA, two reverse gyrases, TopR1 and TopR2, and a "classical" topoisomerase IA, TopA. The unique type II DNA topoisomerase, the TopoVI, is encoded by two genes, one for each subunit A and B (She *et al.*, 2001). The redundancy of the topoisomerase IA questions about the role of these different enzymes and especially for the two reverse gyrases.

To understand the role of each topoisomerase, we characterized the enzymatic features of both TopR1 and TopR2 and we obtained specific antibodies raised against each reverse gyrase. This set of antibodies allows us to detect and quantify the number of each topoisomerase in the cell in a given condition, leading us to decipher their respective functions. Thus, the presence of three topoisomerases IA in most of the *Crenarchaeota* remains to puzzle, in particular concerning the respective role for the two reverse gyrases. The study was opened to the DNA topoisomerase VI.

Unfortunately, in the course of the quantification of the different topoisomerases, we failed to detect TopA in crude extracts although the antibodies recognized the purified recombinant TopA. It is possible that post-translational modifications of TopA could prevent an efficient recognition by the antibodies. In addition we have observed that the corresponding mRNA is present in a very low amount close to the background (unpublished results), we consider that TopA is either not present or present with a too low amount to be detectable in *S. solfataricus* in standard growth conditions. In addition, by using different antibodies, Li and coll. have reported a very faint signal, despite the use in western blot experiments of a very large amount of crude extract *ie* 200 μ g (Li *et al.*, 2011). The use of this large amount prevents any relevant quantification of TopA and is in agreement with a very low amount of TopA in the cell. So, we quantify the two reverse gyrases and the subunits A and B of TopoVI at two temperatures close to the optimal growth temperature, 80°C and 88°C.

S. solfataricus TopoVI is an heterotetramer composed of the subunit TopoVIA and TopoVIB and we obtained specific antibodies raised against each subunit which allow us to quantify independently these two subunits. Surprisingly, we observed that the amount of

TopoVIA is approximately ten fold higher than that of TopoVIB in the two conditions tested. This result strongly suggests that the TopoVIA subunit could have other partners than the TopoVIB subunit in the cell. On the contrary, the amount of TopoVIB per cell corresponds to the amount classically determined in Bacteria such as in *E. coli* (Lopez *et al.*, 2005). The results are totally different with the two reverse gyrases since only some dozens of copies of each protein are present.

This low copy number is in favor of a possible regulatory role of reverse gyrase in the DNA supercoiling homeostasis in *S. solfataricus* and is also in agreement with our previous work. Indeed, we had shown, several years ago, that the two transcripts of reverse gyrases are present in low amount in the cell and that the two reverse gyrase encoded genes are differently regulated after a temperature shift (Garnier and Nadal, 2008). In the same way, we have previously reported that the two reverse gyrases do not exhibit the same enzymatic features. While TopR2 is a highly processive topoisomerase which introduces a very high number of positive supercoils into DNA, TopR1 is a distributive enzyme which introduces a low number of positive supercoils. Moreover, while TopR2 is fully active at 70-75°C, the activity of TopR1 increases with increasing temperature (Bizard *et al.*, 2011).

To determine which topoisomerase(s) play(s) a regulatory role in the DNA supercoiling, we have quantified the variations of the amount of each enzymes after a temperature shift. The consequence in DNA of a temperature change is a modification of the DNA helical repeat which induces a modification of the supercoiling of DNA. The topoisomerases present in the cell at this time act onto DNA, leading to a new superhelical density of the chromosome. The extent and the orientation of the modification depend both on the amount and on the specific activity of each topoisomerase in the target growth conditions. So, in order to know if temperature changes induce in *S. solfataricus* a regulation of the topoisomerases, we have quantified TopR1, TopR2, TopoVIA and TopoVIB by using specific antibodies.

We observed that after an upshift of the temperature starting from 80°C to 88°C, while TopR2 remains constant during the entire time of experiment (6 hours), the amount of TopR1 decreases, reaching half of the initial amount. It is noteworthy that if a reciprocal downshift is made, starting from 88°C to 80°C, the amount of TopR1 increases 2 fold, reaching its initial TopR1 content, while TopR2 remains roughly constant. Since, the quantification of both subunits of TopoVI indicates that they remain constant during the temperature shift, we consider that only TopR1 exhibits significant changes during temperature shifts. This result is

in agreement with the variation of *topR1* transcript after a temperature shift (Garnier and Nadal, 2008). To understand, in terms of supercoiling variation, the consequence of these changes, it is necessary to take into account the variation of the activity that occurs after the temperature shift. Both the amount of each enzyme and their specific activities were indicated in the different tables of the figure 6. Immediately after the temperature shift, we consider that the number of enzyme is unchanged and the change of the helical repeat is wholly transmitted to the supercoiling (the upper left and lower right tables in figure 6). By adding the two effects, the consequence is an increase of the superhelical density for the temperature up shift and a decrease for the temperature downshift (right columns in the tables of figure 6). At this time, a regulation takes place, leading to a decrease of TopR1 for the temperature upshift and conversely an increase of TopR1 for the downshift (see upper right and lower left tables in figure 6 respectively). Again, these changes in TopR1 content trigger a change of the DNA superhelical density and leads to a decrease of it after a temperature upshift while the increase of TopR1 after temperature downshift induces an increase of the superhelical density. The consequence of both the quantities of TopR1 per cell and the variation of its activity driven by the temperature is to restrict the supercoiling variation and lead to a superhelical density adapted to the new temperature.

The homeostatic regulation of DNA supercoiling was described in *E. coli* many years ago. The two main topoisomerases involved in this regulation process possess antagonist activities: the gyrase exhibits a negative supercoiling activity, while ω protein relaxes the negative supercoils. These two opposite actions on DNA supercoiling lead to an intermediate negative superhelical density of the chromosome and it is established that the expression of the corresponding genes are regulated at the transcriptional level by the supercoiling (Menzel and Gellert, 1983 ; Tse-Dinh, 1985). In *S. solfataricus* TopoVI and TopR1 exhibit opposite activities but only the amount of TopR1 changes. This result indicates that TopR1 being the only one to be regulated is the only one to directly participate to the homeostasis of the DNA supercoiling. One particularity is the large difference existing between the amount of the two subunits of the TopoVI. Of course, the amount of active TopoVI might correspond at the maximum to the amount of the less abundant subunit, the TopoVIB. It is possible that the remaining amount of TopoVIA participates to other processes in the cell, independently to its association with TopoVIB.

We previously reported that the amount of *topR1* mRNA is modified after a temperature shift (Garnier and Nadal, 2008) and we propose that the regulation of TopR1 occurs essentially at the transcriptional level. However, previous study failed to observe any effect of supercoiled DNA on the efficiency of the different promoters used. It will be interesting to test whether the promoter region of *topR1* is sensitive to the DNA supercoiling, as suggested by our present results. Finally, we conclude that the role of TopR1 is clearly related to the adaptation at high temperature but the role of the second reverse gyrase, TopR2 remains to be elucidated. Considering the lethality of its deletion mutant (Zhang *et al.*, 2013), its constant amount during exponential growth whatever the temperature and its regulation during the cell cycle (Lundgren and Bernander, 2007) it is possible that TopR2 acts specifically on DNA replication, repair or recombination. Further experiments are needed to decipher its function.

Materials and Methods

Materials.

Tris, glycine, SDS, dimethylsulfoxid (DMSO), acrylamide and bis-acrylamide were purchased from Euromedex. Ponceau S, p-coumaric acid, bromophenol blue, brilliant blue R250, MgSO₄, Ca(NO₃)₂, COSO₄, CuCl₂, ZnSO₄, Na₂M₀O₄, Na₂B₄O₇, FeSO₄, VO₄, vitamins, HEPES, hydrogen peroxide, Tween 20, luminol, Triton X-100, sucrose, acetic acid and dithiothreitol (DTT) were obtained from Sigma. KCl, H₂SO₄ and KH₂PO₄ were from Merck. NaCl was from Fischer scientific. Tryptone peptone and yeast extract were obtained from Difco (Becton Dickinson). Ammonium persulfate (APS), N,N,N',N'-tetra methyl ethylenediamine (TEMED), bovine serum albumin and Bradford reactif were purchased from BioRad. Propan-2-ol, ethanol, sorbitol, HCl, MgCl₂, MnCl₂ and (NH₄)₂SO₄ were from Prolabo. Glycerol was obtained from Acros organique.

Strain.

Sulfolobus solfataricus strain P2 (DSMZ 1617) was purchased from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig, Germany.

Culture of *Sulfolobus solfataricus* P2 in liquid medium.

Sulfolobus solfataricus P2 cultures were performed as previously described (Garnier and Nadal, 2008). Cells were cultivated either at 80°C or 88°C. The cell density was monitored by measuring the optical density at 600 nm (OD_{600nm}). Cells cultivated at 80°C and having reached an exponential growth phase ($0.3 < OD_{600nm} < 0.6$) were transferred to 88°C and maintained at this higher temperature for 6 hours. Similarly, cells growing exponentially at 88°C were transferred to 80°C and maintained at this lower temperature for 6 hours. An aliquot of control cells was maintained either at 80°C or 88°C for up- down- shift experiments respectively. Cell samples were collected at 0, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h and 6h for each set of control and shift experiment.

Crude extract and cell fractionation preparation.

Cell samples ($8.25 \cdot 10^9$ cells) were collected and cooled immediately on ice, and then centrifuged at 4°C at 5000 x g for 5 min. The cells were washed twice with buffer containing 20 mM HEPES and 1 M sorbitol then centrifuged at 4°C at 10000 x g for 6 min. The cells were resuspended to a final cell concentration of $4 \cdot 10^{10}$ cells/ml in extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 7, 15 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 400 mM sorbitol) and were gently

disrupted by the addition of 0.5 % Triton X-100 and by a moderate agitation for 15 min at 4°C. Exponentially growing cells at 80°C and 88°C were fractionated as previously described (Quaiser et al, 2008) to determine the sub-localisation of the two reverse gyrases and the two subunits (A and B) of topoisomerase VI. Protein concentrations of crude extracts and soluble fractions were estimated by the Bradford method with bovine serum albumin as the standard. Before loading onto gel, protein aliquots were denatured with Laemmli buffer and heated at 95°C for 5 min.

Detection of topoisomerases.

Reverse gyrases:

Primary antibodies were made by Eurogentec against two specific epitopes of each reverse gyrase of *S. solfataricus*: PRILYNKQSPTQTEN and EDIQTMMKLLRENIG for anti-TopR1 and GRSKLNKIKKYVEDL and YFSEKRKVEEYINNL for anti-TopR2. The choice of these epitopes was based on both the amino acid sequences deduced from the genome of *S. solfataricus* (She et al, 2001) and the structure of reverse gyrase published (Rodriguez and Stock, 2002). Corresponding peptides were synthesized, linked to hemocyanine and used to immunize rabbits.

Topoisomerase VI:

Primary antibodies raised against the *S. shibatae* B subunit were made by injected purified B subunit to a rabbit. Primary antibodies raised against the *S. shibatae* A subunit were made by Eurogentec against two specific epitopes: FGNSRKKFYLSERE and IPEKITNKDYIA. Corresponding peptides were synthesized, linked to hemocyanine and used to immunize rabbits.

Western blot:

Proteins were separated by using SDS-PAGE (10 % acrylamide / 0.13 % bis-acrylamide). Proteins were further electroblotted onto a nitrocellulose membrane (Whatman Protran BA79) for 1 hour at 4°C in transfer buffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 15 % propan-2-ol). Membranes were stained with Ponceau S, washed with TBS -Tween buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 13.7 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) and blocked with 3 % milk in TBS-Tween. Membranes were then probed over-night at 4°C with either 1/6000^e anti-TopR1 or anti-TopoVIA or anti-TopoVIB antibodies or 1/4000^e anti-TopR2 antibodies. Membranes were then washed with TBS-Tween and probed for 1 hour at 4°C with 1/20000^e horseradish-peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG from donkey (GE Healthcare). All dilutions of

antibodies were performed with TBS-Tween. The immunodetection was visualized with ECL mix (100 mM Tris-HCl pH 8.45, 0.009 % H_2O_2 , 0.225 mM p-coumaric acid, 1.25 mM luminol). The chemiluminescence and Ponceau S signals were captured using a CCD camera (Image Quant LAS 4000, GE Healthcare) and the acquisitions were analyzed with ImageQuant TL (v 7.0) package.

Estimation of topoisomerase number per *S. solfataricus* cell.

The amount of the two reverse gyrases present in various crude extracts of *S. solfataricus* was determined as previously described (Couturier *et al*, *submitted*).

To determine the amount of the A- and B- subunits of topoisomerase VI present in various crude extracts of *S. solfataricus*, we established a relation between ECL signal intensity and the quantity of these two subunits. To do so, the purified recombinant Topoisomerase VI was used as standard and the corresponding ECL signal intensity obtained for each loaded amount (from 1.6 to 25 ng) was used to establish a calibration curve. As the two subunits are expressed in the same amount, the loaded amount corresponding for each subunit is from 0.8 to 12,5 ng. Then, the ECL signal intensity obtained for various crude extracts for each condition was compared with the A- and B- subunits of topoisomerase VI calibration curves respectively (supporting information 1) and converted into the corresponding amount of A- and B- subunits of topoisomerase VI. This quantification of A- and B- subunits of topoisomerase VI were performed with membranes for which the Ponceau S staining was homogeneous between the different loaded crude extracts. To estimate the number of copies of A- and B- subunits of topoisomerase VI per cell, we used the theoretical molecular weight of the corresponding subunit. The quantification data result from at least three independent experiments.

Decatenation assays.

The standard reaction mixture contained 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 20 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, 1.25 mM ATP and 0.16 μg of kDNA (Topogene). After addition of 1.5 pmole of the purified TopoVI, the mixture was incubated at the indicated temperature for 10 min. The reactions were stopped by cooling on ice and by adding 0.1% SDS and $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ of proteinase K. The reaction mixtures were incubated 40 min at 65°C then cooled on ice. 25 mg/ml bromophenol blue and 15% sucrose were added before loading onto the agarose gel. Mono-dimensional gel electrophoresis were performed in a 1.2% agarose gel at room temperature in TEP buffer (36 mM Tris, 30 mM NaH_2PO_4 , 1 mM EDTA,

pH 7.8) and run at 2 V/cm for 2 h. The gel was washed in TEP buffer for 15 min, stained with ethidium bromide (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 30 min) and digitalized under UV light.

References

- Bergerat, A., Gabelle, D. & Forterre, P. (1994). Purification of a DNA topoisomerase II from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae*. *The Journal of biological chemistry* 269(44), 27663–27669.
- Bizard, A., Garnier, F. & Nadal, M. (2011). TopR2, the second reverse gyrase of *Sulfolobus solfataricus*, exhibits unusual properties. *Journal of Molecular Biology* 408(5), 839–849.
- Brochier-Armanet, C. & Forterre, P. (2006). Widespread distribution of archaeal reverse gyrase in thermophilic bacteria suggests a complex history of vertical inheritance and lateral gene transfers. *Archaea (Vancouver, B.C.)* 2(2), 83–93.
- Buhler, C., Gabelle, D., Forterre, P., Wang, J. C. & Bergerat, A. (1998). Reconstitution of DNA topoisomerase VI of the thermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae* from subunits separately overexpressed in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 26(22), 5157–5162.
- Dai, P., Wang, Y., Ye, R., Chen, L. & Huang, L. (2003). DNA topoisomerase III from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* with specific DNA cleavage activity. *Journal of Bacteriology* 185(18), 5500–5507.
- Forterre, P. (2002). A hot story from comparative genomics: reverse gyrase is the only hyperthermophile-specific protein. *Trends in genetics : TIG* 18(5), 236–237.
- Garnier, F. & Nadal, M. (2008). Transcriptional analysis of the two reverse gyrase encoding genes of *Sulfolobus solfataricus* P2 in relation to the growth phases and temperature conditions. *Extremophiles : life under extreme conditions* 12(6), 799–809.
- Kikuchi, A. & Asai, K. (1984). Reverse gyrase—a topoisomerase which introduces positive superhelical turns into DNA. *Nature* 309(5970), 677–681.
- Li, X., Guo, L., Deng, L., Feng, D., Ren, Y., Chu, Y., She, Q. & Huang, L. (2011). Deletion of the topoisomerase III gene in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus islandicus* results in slow growth and defects in cell cycle control. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao* 38(6), 253–259 Elsevier Limited and Science Press.
- Lopez, C. R., Yang, S., Deibler, R. W., Ray, S. A., Pennington, J. M., Digate, R. J., Hastings, P. J., Rosenberg, S. M. & Zechiedrich, E. L. (2005). A role for topoisomerase III in a recombination pathway alternative to RuvABC. *Molecular Microbiology* 58(1), 80–101.
- Lundgren, M. & Bernander, R. (2007). Genome-wide transcription map of an archaeal cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(8), 2939–2944.
- Menzel, R. & Gellert, M. (1983). Regulation of the genes for *E. coli* DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling. *Cell* 34(1), 105–113.
- Mirambeau, G., Duguet, M. & Forterre, P. (1984). ATP-dependent DNA topoisomerase from the archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. Relaxation of supercoiled DNA at high temperature. *Journal of Molecular Biology* 179(3), 559–563.
- Nadal, M. (2007). Reverse gyrase: an insight into the role of DNA-topoisomerases. *Biochimie* 89(4), 447–455.
- Perugino, G., Valenti, A., D'Amaro, A., Rossi, M. & Ciaramella, M. (2009). Reverse gyrase and genome stability in hyperthermophilic organisms. *37(Pt 1)*, 69–73.
- She, Q., Singh, R. K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M. J., Chan-Weiher, C. C., Clausen, I. G., Curtis, B. A., De Moors, A., Erauso, G., Fletcher, C., Gordon, P. M., Heikamp-de Jong, I., Jeffries, A. C., Kozera, C. J., Medina, N., Peng, X., Thi-Ngoc, H. P., Redder, P., Schenk, M. E., Theriault, C., Tolstrup, N., Charlebois, R. L., Doolittle, W. F., Duguet, M., Gaasterland, T., Garrett, R. A., Ragan, M. A., Sensen, C. W. & Van der Oost, J. (2001). The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(14), 7835–7840.
- Tse-Dinh, Y. C. (1985). Regulation of the *Escherichia coli* DNA topoisomerase I gene by DNA supercoiling. *Nucleic Acids Research* 13(13), 4751–4763.
- Wang, J. C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3(6), 430–440.
- Zhang, C., Tian, B., Li, S., Ao, X., Dalgaard, K., Gökce, S., Liang, Y. & She, Q. (2013). Genetic manipulation in *Sulfolobus islandicus* and functional analysis of DNA repair genes. *Biochemical Society Transactions* 41(1), 405–410.

Legends

Table 1- Estimation of the number of TopR and Topoisomerase VI (A- and B- subunits) per cell when cells grow exponentially either at 80°C or 88°C.

Figure 1- Cell density of *S. solfataricus* after a transfer on short scale from 80°C to 88°C (**A**) or from 88°C to 80°C (**B**). The cell density was monitored by measuring the OD at 600nm. *S. solfataricus* culture growing exponentially either at 80°C (**A**) or at 88°C (**B**) was transferred at time point zero (0h) to 88°C or 80°C for 6 hours respectively. The control cultures were maintained at 80°C or at 88°C without temperature transfer. Cell samples were collected from cells growing exponentially (0h), after being transferred (time points: 15' and 30' are expressed in minutes; 1h, 2h, 4h and 6h are expressed in hours) and in control culture at the same time points, for immunodetection analyses.

Figure 2- Immuno-detection of TopR and topoisomerase VI (A- and B- subunits) in relation to the sub-cellular partitioning in 80°C (**A**) and 88°C (**B**) exponential growing cells. Antibodies raised against TopR1 (lanes 1), TopR2 (lanes 2), topoisomerase VI A-subunit (lane 3) and topoisomerase VI B-subunit (lane 4) were used to detect the corresponding protein in crude extracts (CE), soluble (Cy) and chromosomal DNA-enriched (Nu) fractions. 10 µg of crude extract and soluble fraction were loaded for detection of topoisomerase VI A- and B- subunits and TopR1. 50 µg of crude extract and soluble fraction were loaded for detection of TopR2. A different amount of chromosomal DNA-enriched fractions was loaded for detection of topoisomerase VI A and B subunits (40 µg equivalent based on the protein concentration of the Cy fraction) and TopR1 and TopR2 (75 µg equivalent based on the protein concentration of the Cy fraction).

Figure 3- Reverse gyrase content in *S. solfataricus* cells submitted to either up or down temperature shift experiments. (**A-B**) Protein crude extracts were prepared from cells growing exponentially at 80°C (0) transferred to 88°C for 6 hours (up shift ■) or from cells growing exponentially at 88°C (0) transferred to 80°C for 6 hours (down shift □). (**C-D**) Protein crude extracts were prepared from cells growing exponentially either at 80°C (■) or 88°C (□) (time 0) and maintained at this temperature for 6 hours. 10 µg and 50 µg of crude extract were loaded for detection of topoisomerase TopR1 and TopR2 respectively. Quantifications of the specific signals corresponding to western blots obtained with either anti-TopR1 (**A-C**) or anti-

TopR2 (**B-D**) antibodies are shown and are expressed as the number of TopR molecule per cell. The corresponding western blots are shown below each histogram. The different quantification data represent the average of three independent experiments.

Figure 4- Topoisomerase VI B-subunit content in *S. solfataricus* cells submitted to either up or down temperature shift experiments. (**A**) Protein crude extracts were prepared from cells growing exponentially at 80°C (0) transferred to 88°C for 6 hours (up shift ■) or from cells growing exponentially at 88°C (0) transferred to 80°C for 6 hours (down shift □). (**B**) Protein crude extracts were prepared from control cells growing exponentially either at 80°C (■) or 88°C (□) and maintained at this temperature for 6 hours. 10 µg of crude extract were loaded for detection of B-subunit of topoisomerase VI. Quantifications of the specific signals corresponding to western blots obtained with anti-topoisomerase VI B-subunit (**A-B**) antibodies are shown and are expressed as the number of TopR molecule per cell. The corresponding western blots are shown below each histogram. The different quantification data represent the average of three independent experiments.

Figure 5- Activities of recombinant topoisomerase VI from *S. shibatae* as a function of the temperature. TopoVI was incubated in the presence of kDNA at 65°C (lanes 1 and 2), 70°C (lane 3) , 75°C (lane 4) , 80°C (lane 5), 85°C (lanes 6), 90°C (lane 7) and 95°C (lanes 8 and 9). 1.5 pmole of TopoVI has been added to the assays just prior to the incubation in lanes 2 – 8. Control DNA (lanes 1 and 9) were incubated in the same conditions except that dilution buffer was added instead of the TopoVI.

Figure 6- Model of homeostatic regulation of DNA topology occurring in *S. solfataricus* cells evidenced by temperature up- and down-shift experiments. Abbreviations: Act. in vt for enzymatic activity *in vitro*, Nb for Number of topoisomerase molecules per cell, Act. in vv for resulting activity on the DNA supercoiling *in vivo*. R1 for TopR1, R2 for TopR2 and VI for TopoVI.

Supporting information 1- Growth curves of *S. solfataricus* after a transfer on large scale from 80°C to 88°C (**A**) or from 88°C to 80°C (**B**). The cell density was monitored by measuring the OD_{600nm}. A *S. solfataricus* culture growing exponentially either at 80°C (**A**) or at 88°C (**B**) was transferred at time point zero (0h) to 88°C or to 80°C respectively for 28 hours. The control cultures were grown at 80°C or at 88°C without temperature transfer.

The cell density measurements of the first 6 hours have been ever described in Figure 1 and are followed on large scale in this figure.

Supporting information 2- Calibration curves of recombinant topoisomerase VI. The purified recombinant topoisomerase VI of *S. shibatae* was used as standards. The two subunits being expressed with a stoichiometric ratio, it is therefore possible to detect either A- or B- subunit by loading the recombinant topoisomerase VI. Corresponding western blots obtained with either anti-Topo VIA (**A**) or anti-Topo VIB (**B**) antibodies are shown.

Calibration curves, **C** and **D**, were generated by plotting the ECL signal intensity obtained for each loaded amount of the purified recombinant topoisomerase VI subunits (from 0.8 to 12.5 ng). The ECL signal intensity obtained for each crude extract from *S. solfataricus* is comprised in the range of the ECL signal intensity obtained for the loaded amounts of the purified recombinant topoisomerase VI subunits from *S. shibatae*.

Table 1

| | TopR1 per cell | TopR2 per cell | Topo6A per cell | Topo6B per cell |
|---------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| 80°C T0 | 52 ± 7 | 125 ± 11 | 16323 ± 1573 | 1359 ± 410 |
| 88°C T0 | 28 ± 3 | 117 ± 26 | 13032 ± 153 | 1184 ± 214 |

Figure 1

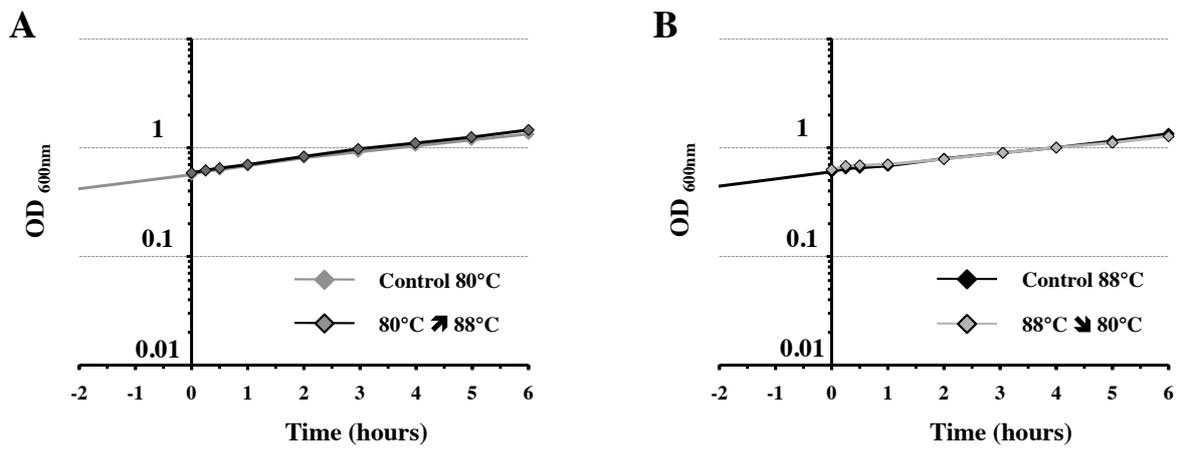


Figure 2

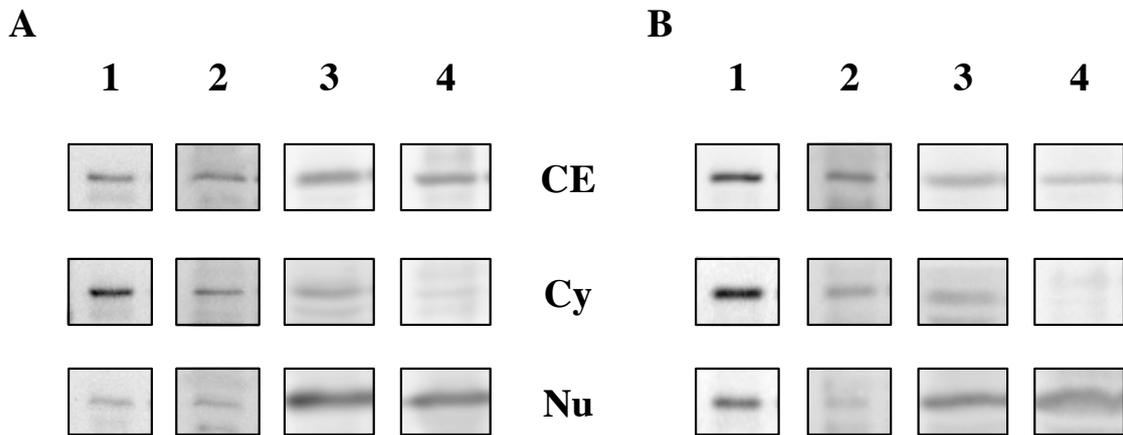


Figure 3

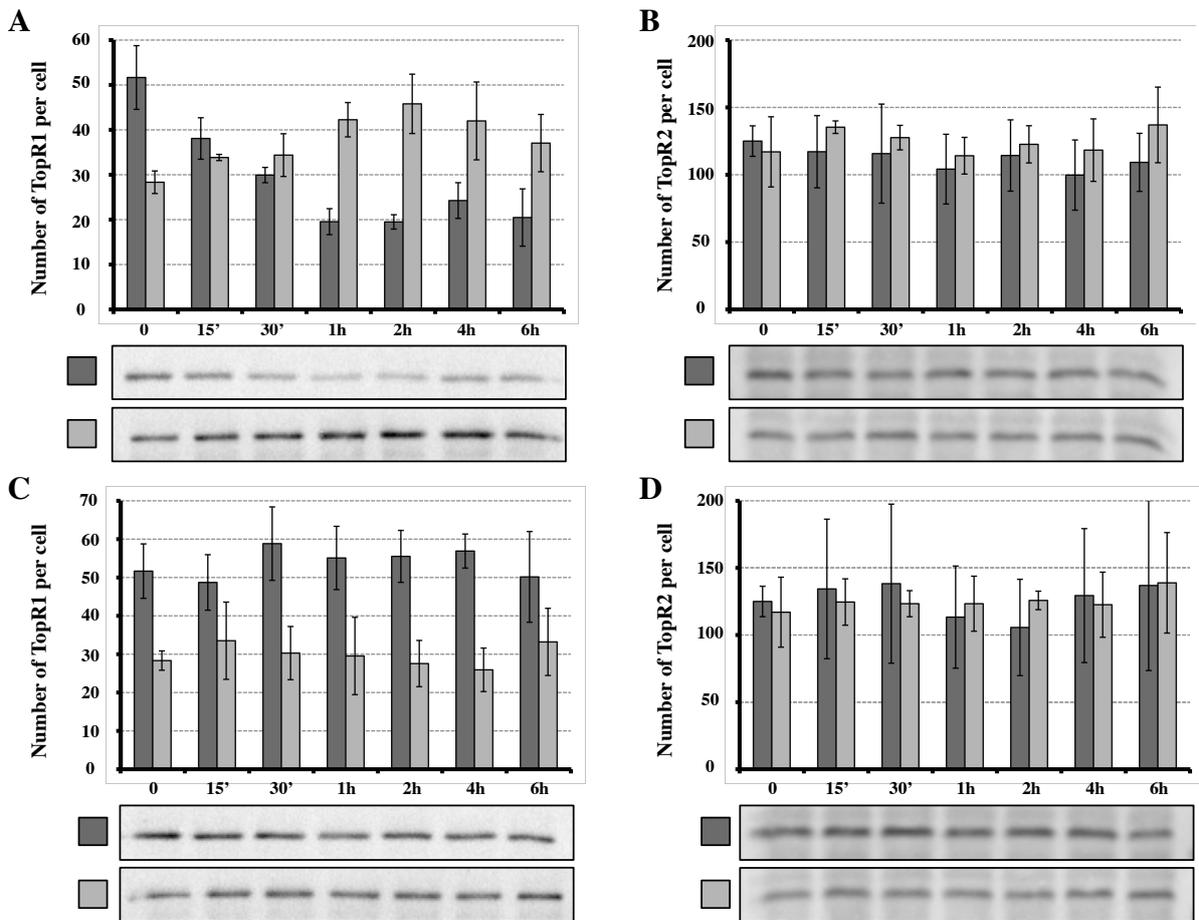


Figure 4

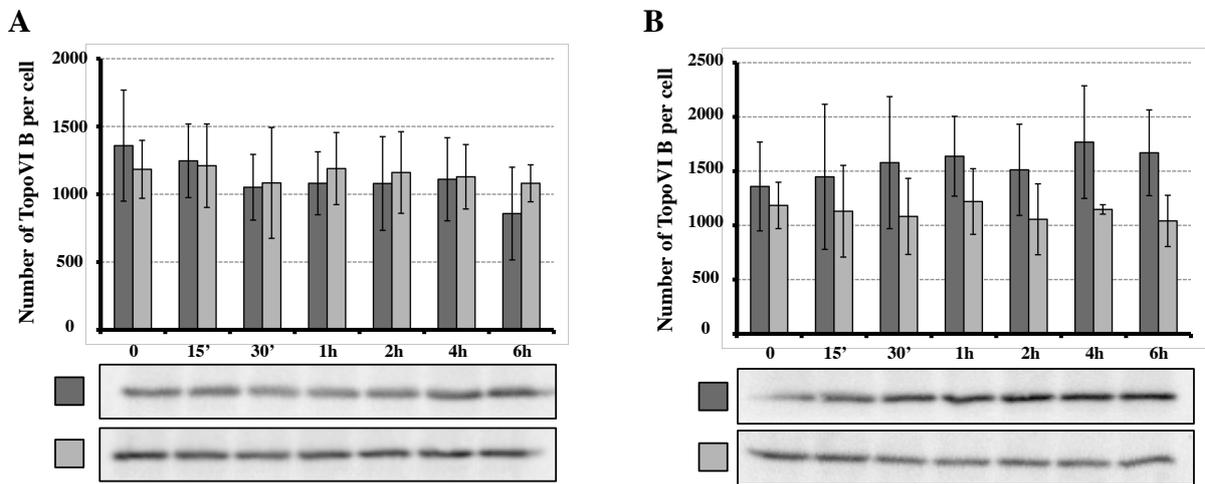


Figure 5

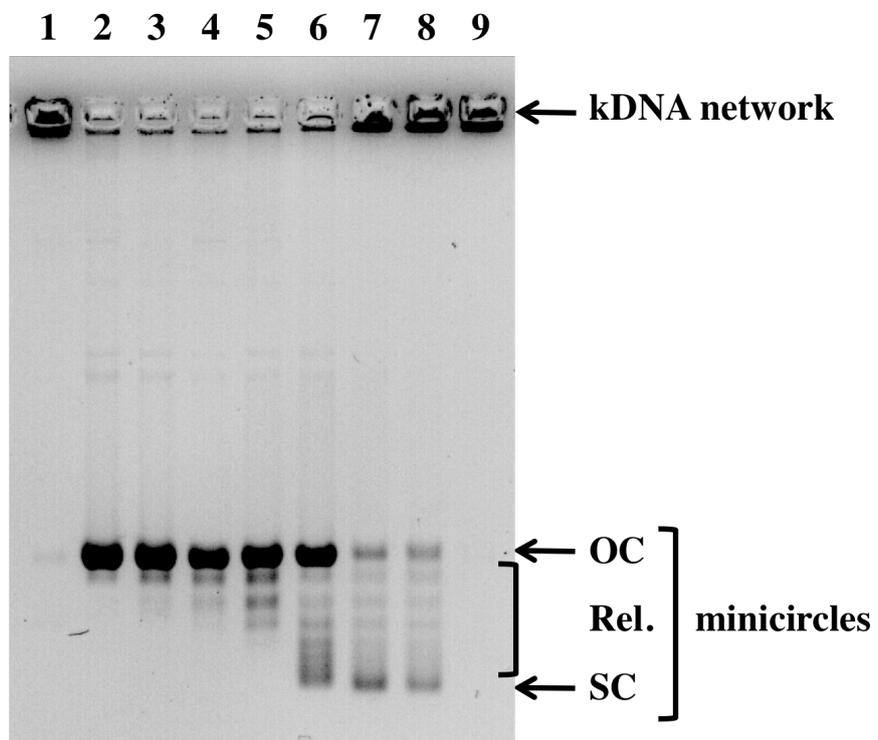
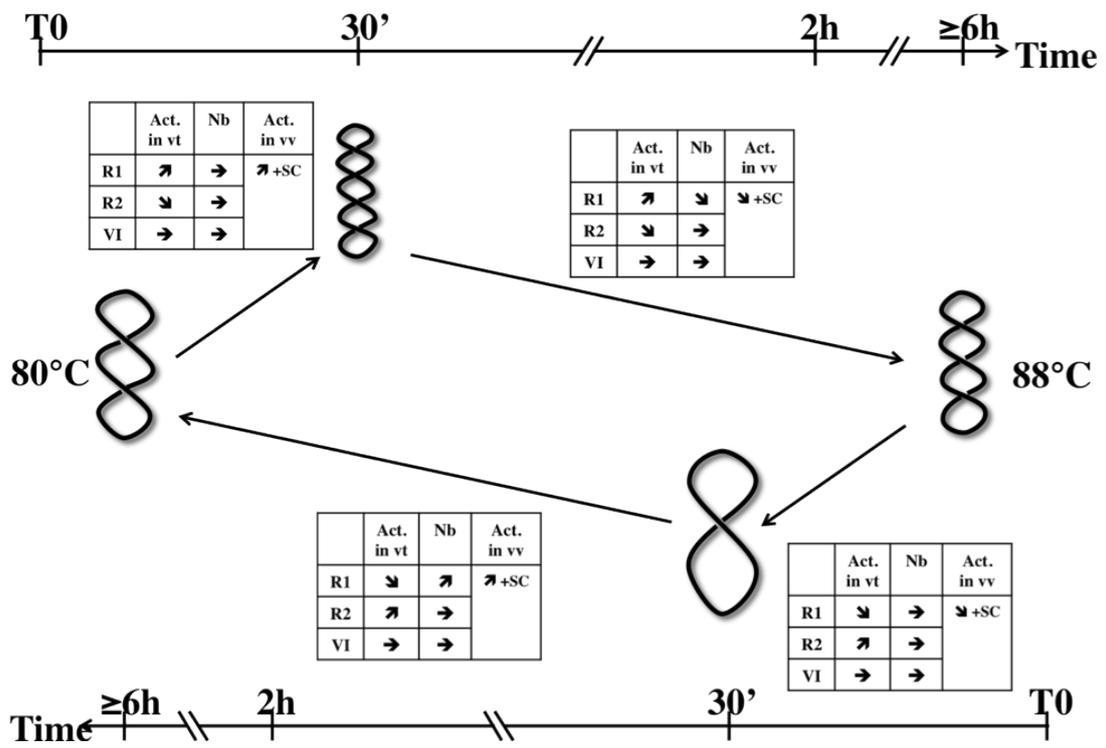
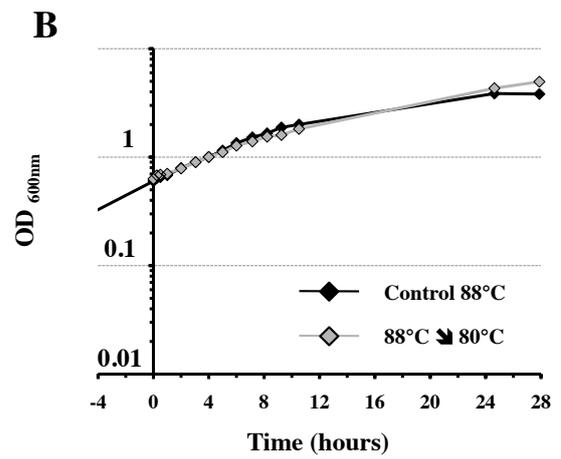
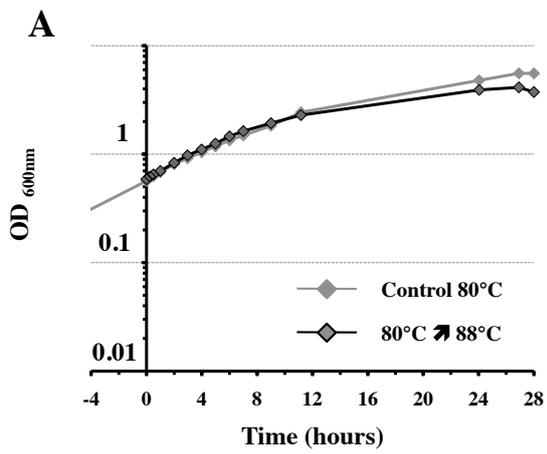


Figure 6



Supporting information 1



Supporting information 2

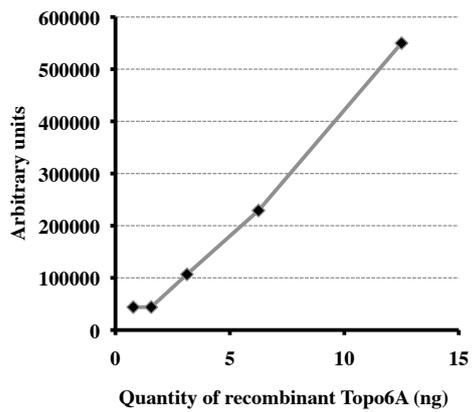
A

Recombinant Topo 6A (ng)

0.8 1.6 3.2 6.25 12.5



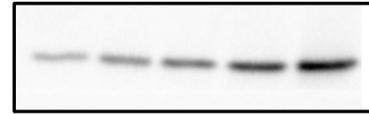
C



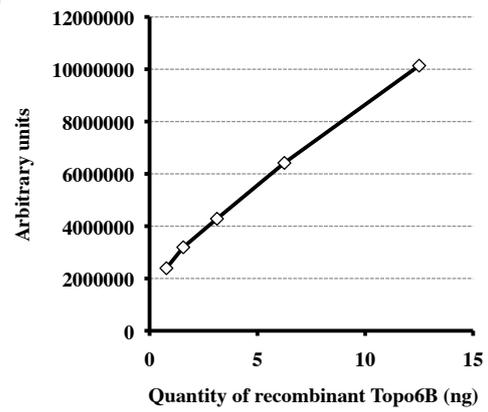
B

Recombinant Topo 6B (ng)

0.8 1.6 3.2 6.25 12.5



D



III- Un hyperthermophile à basse température

Les différents résultats présentés dans les parties précédentes de cette thèse montrent que le *crenarchaeon* hyperthermophile *S. solfataricus* a la capacité de se diviser sur une gamme de températures qui s'étend au moins de 60°C à 88°C. Nous avons montré par ailleurs que TopR1 et TopR2 sont clairement régulées de manière différente. En effet, nous avons pu mettre en évidence que TopR1 semble importante lorsque les cellules se divisent plus ou moins activement et qu'elle intervient dans le contrôle du surenroulement suite à un changement de température. L'implication précise de TopR2 dans un processus cellulaire reste encore à élucider bien qu'il a été montré qu'elle soit présente, aussi bien lorsque les cellules se divisent ou non. Ce résultat suggère que TopR2 puisse être importante dans des conditions physiologiques aussi différentes que celles rencontrées au cours d'une phase exponentielle ou d'une phase de déclin.

Comme nous l'avons déjà vu dans l'introduction (chapitre IV « Thermophilie et Reverse gyrase »), les deux reverse gyrases de *S. solfataricus* ont été caractérisées biochimiquement au sein de l'équipe. Les deux reverse gyrases présentent des propriétés enzymatiques distinctes, étayant ainsi l'hypothèse d'une spécialisation de fonction entre les deux protéines. Bien qu'elles aient toutes les deux une activité de surenroulement positif de l'ADN, deux grandes différences les distinguent : non seulement la distributivité de TopR1 et la processivité de TopR2, mais également la densité de supertours positifs introduits qui est beaucoup plus élevée pour TopR2 que pour TopR1 (Bizard *et al.*, 2011). Le comportement de chacune des deux enzymes vis-à-vis de la température est aussi une des grandes différences qui singularise chaque protéine. TopR1 présente une large gamme de température à laquelle elle est active (60°C-90°C) avec une activité de relaxation dès lors que la température est inférieure à 70°C et une activité de surenroulement positif croissante avec la température, au-delà de 70°C. En revanche, TopR2 présente une activité maximale de surenroulement positif entre 70°C et 75°C ; cette activité est plus faible à des températures inférieures et supérieures à cet optimum pour être finalement complètement inhibée à 90°C (Bizard *et al.*, 2011). Nous avons vu que cette différence de comportement des deux reverse gyrases vis-à-vis de la température *in vitro* avait une incidence directe sur l'implication spécifique de TopR1 dans la régulation homéostatique du surenroulement de l'ADN *in vivo* à haute température.

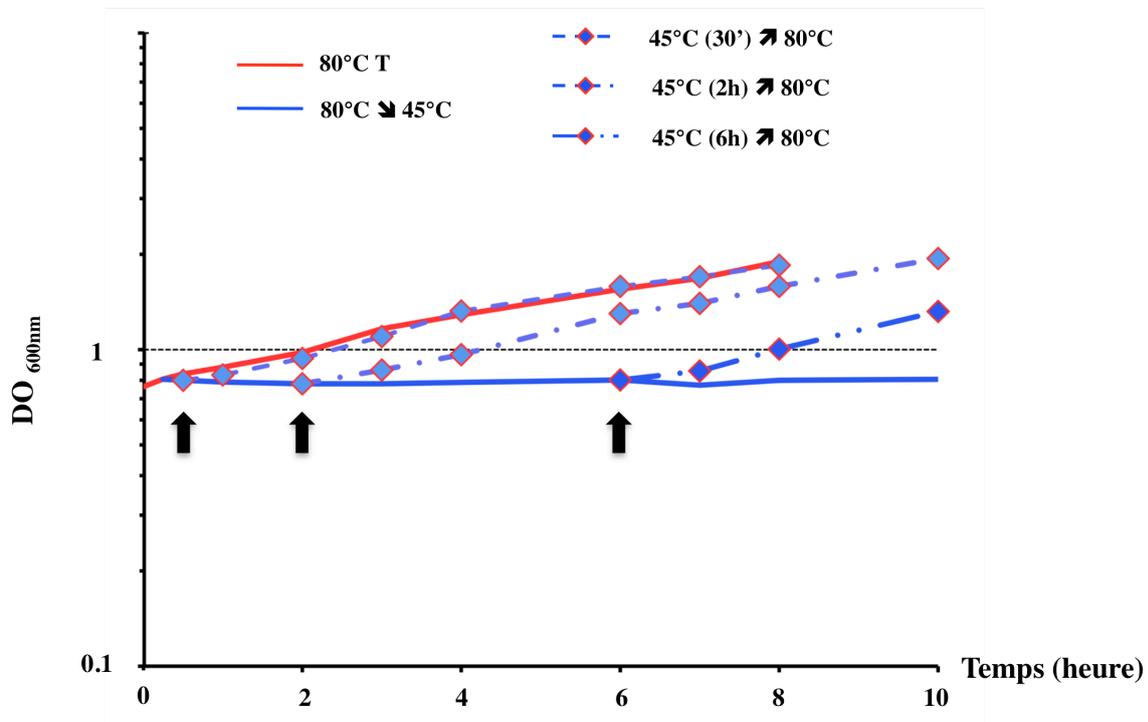


Figure 27- Incidence du transfert des cellules de *S. solfataricus* de 45°C à 80°C sur le taux de division à court terme après différents temps à 45°C.

Des cellules de *S. solfataricus* cultivées en phase exponentielle à 80°C sont soit maintenues à 80°C (courbe rouge) transférées à 45°C sur une période de 10 heures (courbe bleu). L'axe des ordonnées représente le moment du transfert 80°C-45°C. Les cellules transférées à 45°C sont maintenues à cette température pendant 30 minutes, 2 heures et 6 heures et sont divisées en deux lots : un lot témoin maintenu à 45°C tandis que l'autre lot est transféré à 80°C. Chaque transfert est indiqué par une flèche verticale. La densité cellulaire est suivie par mesure de la DO à 600 nm (dont les valeurs sont reportées sur une échelle logarithmique) sur une période de 10 heures.

Compte tenu que nous avons montré que *S. solfataricus* se divise encore avec un temps de génération non négligeable à 60°C (20 heures en phase exponentielle), le contrôle de la topologie de l'ADN doit faire appel à l'intervention entre autres des deux reverse gyrases qui conservent une activité enzymatique à 60°C (Bizard *et al.*, 2011). Il nous a semblé intéressant de poursuivre cette étude à la fois *in vitro* et *in vivo* en testant des températures encore plus basses afin de mieux cerner la température limite en-dessous de laquelle au moins une des deux reverse gyrases n'est plus active et quelles en sont les éventuelles conséquences *in vivo*.

Le test enzymatique à basse température est présenté dans la figure 1 de l'article ci-après. Il en ressort que TopR1 n'est plus active à 45°C alors que TopR2 présente encore une activité de surenroulement positif qu'elle effectue toutefois avec une processivité moindre qu'à sa température optimale de 70°C-75°C. Nous avons donc voulu savoir si le maintien d'une activité par l'une des deux reverse gyrases à 45°C *in vitro* avait une réelle signification biologique pour l'organisme. Nous avons dans un premier temps réalisé des expériences préliminaires de suivi de densité cellulaire par simple mesure de turbidimétrie lorsque *S. solfataricus* était exposé à une température de 45°C.

Au cas où 45°C aurait été une température létale pour *S. solfataricus*, des cellules cultivées en phase exponentielle à 80°C ont été transférées à 45°C pendant une durée de 30 minutes, 2 heures ou 6 heures puis replacées à 80°C (Figure 27). Dès le transfert à 45°C, les cellules répondent très rapidement à ce changement de température puisqu'aucune variation de densité optique n'est visualisée (Figure 27 courbe bleue, trait continu). Ce plateau peut refléter soit un équilibre entre la division cellulaire et la mort cellulaire soit un arrêt de la division. Nous avons montré ultérieurement que ce plateau correspondait bien à une absence de division des cellules à 45°C (cf article ci-après). Lorsque les cellules sont re-transférées à la température de départ, 80°C, le suivi de densité cellulaire montre que, quel que soit le temps d'incubation préalable à 45°C, les cellules sont capables de se diviser à nouveau, comme en témoigne la reprise de l'augmentation de la densité optique (Figure 27). Il n'y a pas de temps de latence et les cellules se redivisent au même taux que les cellules témoins maintenues à 80°C. La température de 45°C ne représente donc pas, au moins à court terme, une température létale pour l'hyperthermophile *S. solfataricus*.

Nous avons ensuite renouvelé l'expérience d'un transfert de cellules de 80°C à 45°C pendant 6 heures, période au cours de laquelle des aliquots de cellules ont été régulièrement prélevés afin de préparer des extraits protéiques totaux et ainsi suivre les variations quantitatives de TopR1 et de TopR2 au cours du temps passé à 45°C.

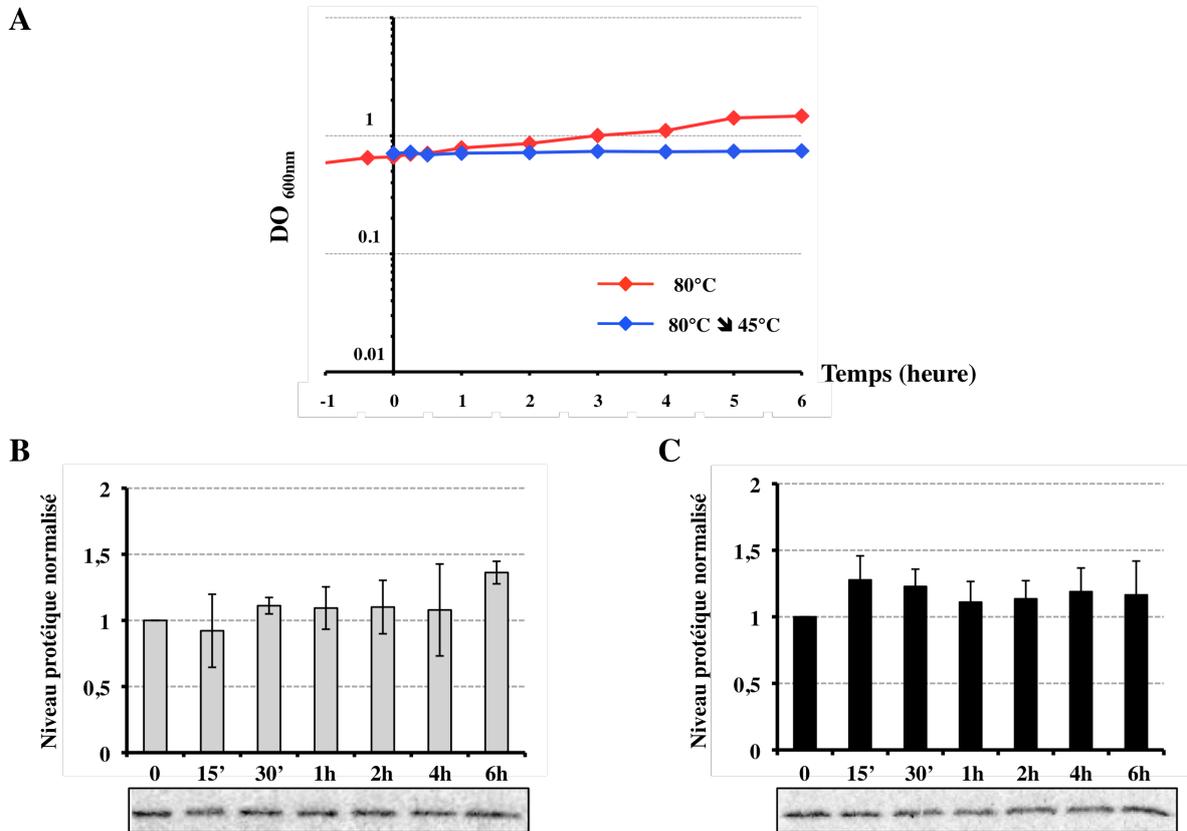


Figure 28- Variations quantitatives à court terme de TopR1 et de TopR2 suite à un transfert des cellules de *S. solfataricus* de 80°C à 45°C (extraits bruts).

Des cellules de *S. solfataricus* en phase exponentielle à 80°C sont maintenues à 80°C (courbe rouge) et un aliquot est transféré à 45°C (courbe bleue). Le transfert de 80°C à 45°C est indiqué par l'axe des ordonnées. La densité cellulaire est suivie (A) par mesure de la DO à 600 nm (dont les valeurs sont reportées sur une échelle logarithmique) sur une période de 6 heures. Les cellules ont été prélevées à différents temps indiqués par la légende 0, 15' et 30' (exprimés en minutes), 1h, 2h, 4h et 6h (exprimés en heure). Les analyses quantitatives du signal d'immuno-détection de TopR1 (B) et de TopR2 (C) des cellules transférées à 45°C aux différents temps sont présentées sous forme d'histogrammes et sont le résultat de deux expériences indépendantes. Les immunopreintes ayant servi à la quantification de TopR1 et de TopR2 dans les extraits bruts sont ajoutées en dessous des histogrammes correspondants. Une quantité protéique de 10 μg et de 50 μg ont été déposées pour la détection de TopR1 et TopR2 pour les extraits totaux. Les quantités relatives de TopR1 et de TopR2 ont été pondérées par la quantité de protéines transférées sur la membrane de nitrocellulose et normalisées par rapport à la quantité de reverse gyrase correspondante détectée au point zéro (0).

Le suivi de la densité cellulaire mené en parallèle montre toujours un plateau pendant les 6 heures où les cellules sont maintenues à 45°C alors que les cellules témoins maintenues à 80°C poursuivent leur croissance (Figure 28A).

Compte tenu qu'un changement réciproque de température (80°C-88°C) appliqué pendant 6 heures a conduit à une régulation du nombre de molécules de TopR1, nous aurions pu nous attendre à ce que de la même manière il y ait une modification du nombre de TopR1 en réponse au transfert des cellules de 80°C à 45°C pendant les 6 heures d'expérience. De manière surprenante, aucune reverse gyrase, ni TopR1 ni TopR2, ne fait l'objet d'une variation quantitative significative sur les 6 heures qui suivent le passage de 80°C à 45°C (Figure 28B et 28C).

Ces expériences préliminaires nous ont permis d'établir qu'*a priori* les cellules de *S. solfataricus* pouvaient supporter une température faible de 45°C au moins pendant quelques heures et qu'elles étaient capables de redémarrer une division rapidement, sans temps de latence et avec un temps de génération similaire à celui des cellules maintenues à 80°C dès lors qu'elles étaient à nouveau incubées à 80°C. Nous avons montré qu'il n'y a pas de variation quantitative significative de TopR1 pendant les 6 heures qui suivent le passage de 80°C à 45°C. Cette absence de variation quantitative significative de TopR1 semble indiquer que si une régulation homéostatique a lieu à une température aussi basse, TopR1 ne serait pas impliquée. Ceci est de plus renforcé par les tests d'activité enzymatique *in vitro* qui montrent que TopR1 n'est plus active à 45°C.

Nous avons alors voulu connaître l'impact d'un passage à 45°C sur une période de temps beaucoup plus longue et déterminer quelle pouvaient être les conséquences sur le contenu en reverse gyrases à plus long terme. Les résultats correspondants sont relatés sous la forme d'un article présenté ci-après.

L'ensemble des expériences que nous avons menées à 45°C nous a permis de démontrer qu'un organisme hyperthermophile tel que *S. solfataricus* est capable de résister à une température (45°C) très inférieure à sa gamme de température habituelle (60°C-88°C) sur une période de temps très longue, de plusieurs semaines. Les cellules maintenues à 45°C cessent de se diviser et n'initient plus de nouveau cycle de réplication. En revanche, elles restent viables et sont capables de restaurer une croissance cellulaire normale lors d'un retour à des conditions de température optimale (80°C). L'état physiologique des cellules maintenues à 45°C s'accompagne de la disparition de TopR1 et d'un maintien de TopR2 en quantité équivalente à celle présente dans des cellules se divisant activement à 80°C.

Ce résultat *in vivo* est en adéquation avec les résultats d'activité enzymatique *in vitro* montrant la perte d'activité de TopR1 et le maintien d'une activité de surenroulement positif significative de TopR2 à 45°C.

Ces résultats suggèrent fortement que TopR1 est requise lorsque les cellules se divisent activement. Il est également fort probable que la présence de TopR1 soit intimement liée à la vie à haute température, assurant ainsi son rôle clé dans la régulation homéostatique du surenroulement de l'ADN. En revanche, le besoin constant de TopR2 dans des cellules qu'elles se divisent ou non suggère que cette seconde reverse gyrase serait plutôt impliquée dans le contrôle de la stabilité du génome.

ARTICLE 2 :

Insight into cellular involvements of the two reverse gyrases
of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*.

Couturier M., Bizard A., Garnier F., Nadal M.

Article soumis une première fois en février 2013 à *Journal of Bacteriology*

Article ré-écrit entièrement et soumis en juillet 2013 à *BMC Molecular Biology*

Article en révision pour re-soumission à *BMC Molecular Biology*

Title

Insight into cellular involvements of the two reverse gyrases of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*.

Names

Mohea Couturier^{1,2,3}, Anna Bizard^{1,2,4}, Florence Garnier^{1,2#} & Marc Nadal^{1,2#}

FG and MN contributed equally to this work.

mohea.couturier@igmors.u-psud.fr

ahb@sund.ku.dk

florence.garnier@igmors.u-psud.fr

marc.nadal@igmors.u-psud.fr

Addresses

1: Université Versailles St-Quentin, 45 avenue des Etats-Unis, 78035 Versailles, France

2: Institut de Génétique et Microbiologie, UMR 8621 CNRS

Université Paris-Sud, Bât. 409, 91405 Orsay Cedex, France

3: Université d'Evry-Val d'Essonne, Boulevard François Mitterrand, 91025 Evry, France

4: *Present address*: University of Copenhagen, Institute of Cellular and Molecular Medicine (ICMM), Center for Healthy Ageing (CEHA), Blegdamsvej 3B, DK-2200 København N

#: Corresponding authors, phone: 33 1 69 15 57 18 or 33 1 69 15 68 04, Fax: 33 1 69 15 78 08

E-mail: florence.garnier@igmors.u-psud.fr

marc.nadal@igmors.u-psud.fr

Abstract

Background: Reverse gyrase is a DNA topoisomerase characterized by its unique DNA positive supercoiling activity. *Sulfolobus solfataricus*, as most of Crenarchaeota, contains two copies of the reverse gyrase encoding gene. We showed previously that both genes are differently regulated in relation to temperature conditions and that both purified recombinant reverse gyrases exhibit different enzymatic characteristics. Such specific features might be correlated to a specialization of functions between both reverse gyrases. Since no mutant for TopR genes could be obtained in Sulfolobales, we performed immunodetection approaches to get the first *in vivo* data on the function(s) of these proteins in *S. solfataricus*. In particular, we wanted to decipher whether only one reverse gyrase or both is/are related to the hyperthermophilic lifestyle and/or to essential functions associated with the whole cell activity.

Results: For the first time, the reverse gyrase content has been precisely estimated *in vivo*. *S. solfataricus* cells actively dividing at 80°C contain a low level of both reverse gyrases, approximately 50 TopR1 and 125 TopR2 molecules per cell. *S. solfataricus* cells are resistant at 45°C even upon a prolonged time period of several weeks. There is neither cell division nor replication initiation at 45°C, but these cell processes are fully restored upon a return to 80°C. TopR1 is almost no more present after three weeks at 45°C while TopR2 remains constant. The *in vitro* enzymatic assays show that TopR1 is not active at 45°C and that TopR2 is still able to produce a highly positively supercoiled DNA in significant amount at 45°C. These data support the biological relevance of *in vivo* results.

Conclusions: The two reverse gyrases of *S. solfataricus* are quantitatively differently regulated at the protein level in *in vivo* experiments supporting the involvement of TopR1 and TopR2 in different functions within the cell. Our results strongly suggest that TopR1 is required when cells actively divide and/or associated with life at high temperatures. By contrast, the constant need of TopR2 when cells divide or not in the temperature conditions tested suggest that it is rather involved, at least, in specific DNA transaction processes required for genome stability.

Keywords: Archaea, hyperthermophile, topoisomerase, supercoiling, topology, low temperature, cytometry, TopR, quantification

Background

DNA topoisomerases are enzymes responsible for changing the DNA topological state. Based on the single- or double-strand breakage transiently displayed during their activities, topoisomerases are divided in type I or type II respectively [1, 2]. Reverse gyrase is a particular type I topoisomerase characterized by its unique DNA positive supercoiling activity [3-5]. This peculiar activity derives from its chimeric natural state: it is composed of a N-terminal SF2-helicase domain fused to a C-terminal topoisomerase IA domain [6-8]. The reverse gyrase was initially discovered only in hyperthermophilic and thermophilic organisms, either *Archaea* or *Bacteria* [9-12]. It was therefore predicted that corresponding gene(s) might be essential for life at high temperature [13]. This attractive hypothesis was not further supported in the case of *Thermococcus kodakaraensis*, a hyperthermophilic organism belonging to the Euryarchaeota phylum, for which reverse gyrase was shown to be not essential [14]. However, if the corresponding mutant was gradually affected in its growth rate from 60°C to 90°C, no growth was observed at higher temperatures, somehow confirming a specific role of reverse gyrase in thermoadaptation. This putative role was strengthened by the discovery of a reverse gyrase encoding gene in some moderately thermophilic bacteria. Indeed, the highly induced corresponding gene expression rate observed when cells were exposed to higher temperature could represent a selective advantage for such organisms which live close to hydrothermal vents and where frequent and rapid temperature fluctuations could occur [15]. The situation seems to be different in hyperthermophilic organisms possessing two reverse gyrase encoding genes. Indeed, both *topR1* and *topR2* genes were recently demonstrated to be essential in *Sulfolobus islandicus* [16]. Thus both reverse gyrase genes in Sulfolobales and possibly in all Crenarchaeota containing two copies of reverse gyrase, seem to be linked either to the hyperthermophilic lifestyle and/or to essential functions related to the whole cell activity. It is well admitted that topoisomerases are involved in all DNA transaction processes (transcription, replication, recombination, repair and chromosome segregation). Indeed the DNA linking number is locally modified by the appropriate topoisomerase activity in order to eliminate the excess of negative and positive supercoils generated upstream and downstream the corresponding machinery of these DNA tracking processes respectively [17]. However, several functions based on *in vitro* experiments have been proposed, and only a few studies could clearly demonstrate the direct implication of topoisomerases in one or the other of these DNA transaction processes *in vivo*. A homeostatic control of DNA supercoiling has been reported in mesophilic bacteria such as *Escherichia coli* due to the antagonistic activities, w protein (TopA) and DNA gyrase, performing

negative supercoil relaxation and negative supercoiling respectively. Similarly a homeostatic control of DNA supercoiling has been suggested in hyperthermophilic archaea [18]. Indeed, these organisms also exhibit antagonistic activities: in addition to the reverse gyrase, they possess another type IA topoisomerase, the topoisomerase III, which relaxes exclusively negatively supercoiled DNA [19, 20], and one type II topoisomerase, the topoisomerase VI, which relaxes both negatively and positively supercoiled DNA [21]. We will then focus on the different functions proposed specifically for reverse gyrase. The unique positive supercoiling activity of reverse gyrase was proposed to stabilize the DNA duplex against denaturation in hyperthermophilic and thermophilic organisms living in extreme temperature environments [8, 22]. It was also shown that reverse gyrase acts *in vitro* as a heat-protective DNA chaperone, independently of its supercoiling activity [23]. Reverse gyrase might play a crucial role in response to DNA damage since it was shown to be specifically recruited to DNA after UV irradiation [24]. The single-strand DNA binding protein (SSB) stimulates the positive supercoiling reaction of reverse gyrase and a functional interaction between both proteins was confirmed *in vivo* [24]. These results represent another argument to consider that reverse gyrase might be effectively implied in DNA repair and recombination. A role of renaturase for reverse gyrase has been proposed since it efficiently anneals complementary single-stranded circles and introduces positive supercoils into DNA containing a bubble, therefore contributing to the genome stability by eliminating impaired regions [25]. The chimeric structure of the reverse gyrase associating a SF2-helicase domain and a topoisomase IA domain within the same polypeptide, is reminiscent of the physical and functional interaction between the RecQ-like protein and topoisomerase III. This protein couple is present in *Bacteria* and *Eukarya*, and is known to be involved in DNA repair and recombination needed for genome stability [26-28]. Such a role of reverse gyrase in maintenance of genome stability has been therefore proposed in hyperthermophilic archaea [8, 29]. Quite recently, it was shown *in vitro* that reverse gyrase (TopR1) inhibits the activity of the translesion DNA polymerase PolY, thus possibly preventing the potential high mutational effect of PolY [30], another way to maintain the genome stability in hyperthermophilic organisms. An implication of TopR1 from *S. solfataricus* in recombination and repair has been illustrated by its unwinding activity of substrates containing helical junctions [31].

It is likely that reverse gyrase assumes several functions in the cell, probably by interacting with different partners according to the corresponding cell process. The redundancy of reverse gyrase encoding genes in most members of the Crenarchaeota phylum

strongly suggests a specialization and a distribution of functions between both reverse gyrases, TopR1 and TopR2. Both genes being essential in Sulfolobales, one might adopt a physiological approach to evidence a differential regulation of both enzymes, in attempt to get new insights into the respective roles displayed by the two distinct reverse gyrases. We previously showed that the expression rate of *topR1* and *topR2* genes from *S. solfataricus* P2 is differently regulated in relation to the growth phases and temperature conditions [18]. In addition, we performed *in vitro* experiments on both purified recombinant reverse gyrases from *S. solfataricus* and we showed that they exhibit different enzymatic characteristics and in particular a different behavior with temperature [32].

In this article, we wanted to precise *in vitro* the lowest temperature at which there is still a reverse gyrase activity and use this low temperature for *in vivo* experiments to determine whether *S. solfataricus* P2 cells are able to adapt its reverse gyrase content. TopR1 is not active at 45°C while TopR2 is still able to perform a significant positive supercoiling activity. We determined for the first time the amount of reverse gyrase molecules per cell. *S. solfataricus* contains approximately 50 molecules of TopR1 and 125 molecules of TopR2 per cell when cells are actively dividing at 80°C. In the light of this quantitative information, the biological significance of the different *in vitro* roles proposed for reverse gyrase will be discussed. After three weeks at 45°C, the level of TopR1 drastically decreases while that of TopR2 remains constant. When the cells are transferred back to 80°C, growth ability is recovered with the same rate as 80°C control cells and the level of TopR1 characteristic of actively dividing cell is restored.

Results and Discussion

TopR2 is still active at 45°C, but not TopR1.

In a previous report, we demonstrated that the two reverse gyrases of *S. solfataricus* exhibit different enzymatic properties [32]. If both enzymes are able to introduce positive supercoils into DNA, TopR2 is much more efficient than TopR1, not only by its rapidity to do it but also by the higher degree of positive supercoil density produced. This difference might be mainly due to the very high processivity of TopR2 while TopR1 is distributive. The activity of TopR1 is strictly dependent on the temperature from relaxation at 60°C to progressive increase of the linking number with increasing temperature, the maximum of positive supercoiling being reached at 90°C. By contrast, TopR2 is not active at high temperature (its optimal temperature is around 70°C), but still exhibits a significant positive supercoiling activity at 60°C [32]. Thus, the temperature is an important parameter to

distinguish both reverse gyrases. In the literature several reports illustrate that different protein machineries from hyperthermophilic organisms belonging to the *Sulfolobus* genus are still functional at low temperature, such as the proton pump [33], the transcription machinery [34], the replication and repair DNA polymerases [35] and DNA topoisomerase(s) as well [36]. Because transcription and replication are two major DNA tracking processes which necessarily require the involvement of DNA topoisomerases, we therefore wanted to check whether both reverse gyrases of *S. solfataricus* are also active at temperatures below 60°C, the lowest temperature previously tested [32]. Considering that enzymes usually exhibit a lower activity at low temperature, we used a topoisomerase:DNA molar ratio of 4 to observe more clearly the presence of eventual weak activities. We have performed activity assays at low temperatures (ranging from 45°C to 55°C) and we have included in the same set of experiments the previously tested temperatures as controls (from 60°C to 80°C) in order to have a better display of the extent of both TopR1 and TopR2 activities within this new temperature range (Figure 1). The main characteristics of both TopR1 and TopR2 were retrieved in control temperature assays with the molar ratio of 4. At lower temperatures than 60°C, TopR1 still exhibits a faint relaxation activity at 55°C and 50°C but no more activity at 45°C (Figure 1A). The significant positive supercoiling activity of TopR1 is observed only above 70°C (Figure 1A for control, and [32]). In addition, when TopR1 is active, its distributivity property is confirmed whatever the temperature tested, except at 45°C where no activity was detected. By contrast, TopR2 is still active at temperature as low as 45°C as indicated by the topoisomer profile obtained in mono-dimensional gel electrophoresis (Figure 1B). With the two-dimensional gel electrophoresis, we clearly show that TopR2 is still able to introduce a high number of positive supercoils into DNA at 45°C (Figure 1C). If the extent of the positive supercoil density seems to be rather similar to that obtained at 70°C, the population of highly positively supercoiled plasmid is however less abundant (Figure 1C). This could be due to the fact that TopR2 becomes less processive at lower temperature since we observed a wider range of intermediate topoisomers ranging from more or less highly positively supercoiled to negatively supercoiled when temperature decreases, particularly at 45°C and 50°C (Figure 1C). Such a modification of the processivity depending on temperature has been recently reported for DNA replication (Dpo1) and repair (Dpo4) polymerases from *S. solfataricus* [35]. In addition, within the temperature range of 45-60°C, we observed that TopR2 produces a higher amount of nicked DNA (Figure 1C). This clearly indicates that it is not the step of DNA cleavage displayed by TopR2 which is inhibited at low temperature.

It would be rather the religation step which could be less efficient and/or the strand passage reaction which could be inhibited at low temperature. Interestingly, the overproduction of nicked DNA is not observed for TopR1 underlining once again the difference between these two enzymes. In conclusion, in our conditions, 45°C represents a low temperature to which TopR2 preserves a significant highly positive supercoiling activity while TopR1 is not active anymore. Based on these results obtained *in vitro*, we decided to test whether *S. solfataricus* would be able to support for a long time this low temperature and study the consequences on the reverse gyrase content in an *in vivo* context.

***S. solfataricus* cells with preserved membrane integrity at 45°C, but no cell division ability.**

To determine the effects of the low temperature of 45°C on the protein levels of the two reverse gyrases in *S. solfataricus* cells over a long period, we first checked that cells were resistant to this cold environment by controlling the cell density, the membrane integrity and the DNA content cell distribution. We transferred the 80°C exponentially growing cells to 45°C and then maintained cells at 45°C for three weeks. The cell density has been estimated both by optical density at 600 nm and by flow cytometry and we clearly established that the measure of the OD precisely reflects the number of cells analysed by flow cytometry. In spite of a very slight increase of OD during the first two days, the cell density remains roughly constant during the three weeks at 45°C (Figure 2A). To be sure that this plateau was not due to a modification of the growth medium composition over a long period at 45°C, we regularly changed the culture medium every week over the time course of the experiment (see materials and methods). In spite of the fresh medium supply, the cell response after being transferred from 80°C to 45°C was the same (data not shown). Thus, the plateau observed over a period of three weeks at 45°C is rather due to the temperature change than to a modification of the culture medium composition.

By using phase contrast microscopy, we have seen that both 80°C control cells and 45°C transferred cells present the same round shape (Figure 2B) and an average value of the cell size was calculated from at least 200 cells in each condition. Both 80°C control cells and 45°C transferred cells exhibit a relatively small size with no significant differences ($1.6 \mu\text{m} \pm 0.3$ and $1.53 \mu\text{m} \pm 0.27$ respectively). Indeed at 45°C, the cell size remains constant whatever the cell harvesting time point over the three weeks (Figure 2B, panels b-d compared with panel a). Similarly, no variation in cell size was reported for *Sulfolobus* cells transferred at room temperature or in ice-water [37].

When cells are exposed to an environmental condition different from the optimal growth conditions, they are possibly affected in their cell membrane integrity. The LIVE/DEAD® *BacLight*TM Bacterial Viability Kit has been developed to rapidly and reliably distinguish live and dead bacteria [38] and this kit has been also successfully used for archaea [39]. The cell labeling relies on the cell membrane integrity property by using two nucleic acid stain fluorescent probes that differ in their ability to penetrate cells with preserved membrane integrity. Indeed SYTO® 9 stain labels in green fluorescence both live and damaged or dead cells whereas propidium iodide penetrates only cells with damaged membranes and stains cells in red fluorescence. Therefore, in attempt to visualize an eventual modification of the membrane integrity when *Sulfolobus* cells are transferred to 45°C, we performed a cell labeling by using the LIVE/DEAD® *BacLight*TM Bacterial Viability Kit. As no significant background noise occurred during the detection of both fluorescence signals, we decided to show only undeconvoluted Z-series images (Figure 2C). As expected, the 80°C exponentially growing cells exhibit a very low amount of damaged cells (Figure 2C, panel a). When cells are transferred from 80°C to 45°C for 21 days, the amount of cells with preserved membrane integrity is similar to 80°C control cells (Figure 2C, panels b-d). This result strongly suggests that cells do not lyse but are rather resistant to this low temperature even after a long period. Interestingly, the pH of the culture medium remains acidic (pH 4) over the three weeks at 45°C suggesting that the proton pump is still active as reported for *S. acidocaldarius* and efficiently prevent an acidification of the cytosol [33]. However, it was previously notified that for a long-term survival of cells transferred at room temperature [37] it was necessary to neutralize the pH. In the case of a transfer of *S. solfataricus* cells to 45°C, it clearly does not require any adjustment of the pH to neutral value to maintain the cell membrane integrity.

To determine whether the temperature of 45°C could generate a modification of the cell distribution based upon the DNA content, the different cell samples were analysed by flow cytometry. The 80°C control cells (Figure 2D, panel a) are separated into three sub-populations as previously described [40]: a minor population containing one genome equivalent, a medium population with a DNA content between one and two genome equivalents and the largest cell population containing two genome equivalents. The proportion of the different populations for 80°C exponentially growing *S. solfataricus* cells is in agreement with the relative lengths of periods of cell cycle previously reported for actively dividing cells of *Sulfolobus* [40]. The cell distribution is drastically modified when cell samples were collected after a prolonged incubation at 45°C. Indeed, the corresponding

cytograms observed at 7, 14 and 21 days at 45°C are characterized by the disappearance of cells with a DNA content between one and two genome equivalents. The cell number containing one genome is still corresponding to a small part of the cell population and the cells with two genome equivalents represent the major population (Figure 2D, panels c-d). The absence of cells with intermediate amounts of DNA upon a prolonged period at 45°C necessarily reflects the absence of active replication process. Since the cell density remains constant during the same time period, it is reasonable to correlate the absence of replication with the absence of cell division at 45°C. However, the disappearance of cells with intermediate DNA amount could be explained by two putative processes, either DNA degradation or ongoing of the last replication round possible at this low temperature. If we consider the DNA degradation hypothesis, it could concern either the DNA strand in course of polymerisation only or both the elongating one and the template DNA strand. A degradation of the DNA strand in course of polymerisation only, must be rejected since this process implies a large increase of the cell population harboring one genome and this is clearly not in accordance with our results. In case of degradation affecting both DNA strands, one might consider that the corresponding cell population would be therefore lysed or exhibit damaged membrane. Both our results of cell counting and cell labeling did not show any variation of the proportion of cells with altered membrane when maintained at 45°C, even after three weeks. Our results do not agree with the hypothesis of double strand DNA degradation. On the other hand, since it was recently shown in the literature that the replication and repair DNA polymerases of *S. solfataricus* are still functional, at least *in vitro*, at low temperatures [35], one could consider that in our experiments, the replication process can be still active in cells maintained at 45°C. However, cells maintained at 45°C over a long period do not exhibit any replication activity. By contrast, when cell samples were collected during the first 48 hours following the transfer from 80°C to 45°C, the cell distribution still comprises a significant amount of cells with an intermediate DNA content, except that it is slightly but significantly closer to a DNA content comprised between 1.5 and 2 equivalent genomes (data not shown). This result suggests that cells having initiated replication prior to the temperature shift would be able to pursue the current DNA replication. As indicated by the cell density curve, there is a slight OD increase during these first two days, corresponding to a slight increase of cell density suggesting a residual cell division. However, it is reasonable to presume that the replication rate might be slower at 45°C, at least partly due to a reduced processivity of the replication and repair polymerases of *S. solfataricus* with decreasing temperatures [35]. We cannot exclude that during the same time period, initiation

of replication could occur as well. In the literature, it was shown that during the cell cycle of *Sulfolobus* cultivated at 80°C, a new round of replication could occur only when cell division has been completed [41]. This chronology in cell events could sustain that at 45°C it is the inability of cells to divide which prevents the initiation of replication to occur. However we cannot completely exclude the opposite scenario according to which the absence of cell division would be the consequence of no replication activity upon a prolonged incubation at 45°C. In any case, the absence of cells with an intermediate DNA content after seven days at 45°C is clearly indicative that no new replication round could occur upon a prolonged incubation at 45°C.

When cells maintained at 45°C for 21 days were transferred back to 80°C, there is immediately a transient slight decrease of the OD occurring slowly within a couple of hours (Figure 2A). Beyond, the OD continues to increase progressively and the growth curve of the cells transferred from 45°C to 80°C is rather similar with that obtained for 80°C control cells (Figure 2A). Once again no change in the cell size was observed upon a return to 80°C ($1.6 \mu\text{m} \pm 0.27$) (Figure 2B, panel e) and the proportion of damaged cells remains very low as for actively dividing cells at 80°C (Figure 2C, panel e). In flow cytometry, the cytogram of cells transferred back to 80°C and collected 24 hours after the up-shift, is similar to that of the 80°C control cells (Figure 2D, panel e and panel a respectively). Indeed, the presence of cells with an intermediate DNA content is fully restored, indicating that a normal replication activity was recovered. The *Sulfolobus* cells maintained at 45°C for three weeks have therefore retained their ability to grow again actively at 80°C even after a long period at low temperature. Such a property has been also reported in the case of *Sulfolobus* cells kept for a short time either at room temperature and transferred back to their optimal growth temperature [41].

Whatever the direction of temperature shift (from 80°C to 45°C or from 45°C to 80°C), we do notice a symmetric and reproducible variation of the FSC parameter, increasing during the down-shift and decreasing during the up-shift. As no associated change in cell size was observed, the FSC modification could be rather attributed to a modification of the cell composition. It could be due to a variation of the lipid membrane composition. Indeed, it has been already reported that the number of cyclopentane rings in the tetraether lipids of *Sulfolobus* membranes varies with temperature [42]. Alternatively, the composition and/or the properties of the flexible cell wall could be also modified by the temperature change.

In conclusion, *S. solfataricus* cells maintained over a long time period at 45°C are resistant to this low temperature and are able to recover a normal cell activity, *i. e.* cell division and replication when they are transferred back to 80°C.

TopR1 and TopR2 quantified in *S. solfataricus* cells at 80°C and 45°C.

Because we observed that *S. solfataricus*, a hyperthermophilic organism, is resistant to a quite cold temperature even after a long period of several weeks, we wanted to check whether this resistance was associated with a modification of the reverse gyrase content. In order to distinguish both reverse gyrases, TopR1 and TopR2, present in crude extracts, we designed two peptides specific of each reverse gyrase to raise specific antibodies (see materials and methods).

The specificity of both antibodies was checked by using the recombinant proteins, TopR1 and TopR2, previously purified in our lab [32]. When a quite very low amount of purified recombinant TopR1 of *S. solfataricus* was loaded (0.3 ng), the anti-TopR1 antibodies were able to recognize TopR1 of *S. solfataricus* (Figure 3A, lane 1). As expected, no signal was detected between the anti-TopR1 antibodies and the purified recombinant TopR2 of *S. solfataricus* even with a larger amount of protein loaded (50 ng) (Figure 3A, lane 2). The anti-TopR2 antibodies recognize the TopR2 recombinant protein of *S. solfataricus* with a significant signal when 50 ng of purified recombinant TopR2 was loaded (Figure 3B, lane 2). Similarly there was no cross-reaction between anti-TopR2 antibodies and the purified recombinant TopR1 of *S. solfataricus* even when 50 ng was used for loading (Figure 3B, lane 1). From these results, we concluded that the two antibodies were specific of each reverse gyrase of *S. solfataricus*, TopR1 and TopR2, respectively.

In crude extracts of *S. solfataricus*, the anti-TopR1 antibodies recognize only one band with a high signal, and the corresponding migration is in agreement with the theoretical molecular mass of TopR1 (146.65 kDa) (Figure 3A, lane 3). The anti-TopR2 antibodies recognize several bands of which, one exhibits a higher signal and corresponds to TopR2 (theoretical molecular mass: 132.6 kDa) (Figure 3B, lane 3). The comparison of the electrophoretic migration of the protein detected in the *S. solfataricus* crude extract with the recombinant TopR2 indicates a higher apparent molecular mass for TopR2 detected in the crude extract (Figure 3B, lane 3 versus lane 2, respectively) possibly due to post-translational modification(s). It should be noted that no band was detected when the *S. solfataricus* crude extract was only incubated with secondary antibodies (Figure 3C). The two specific sera were

used to quantify the two reverse gyrases in different crude extracts prepared from *S. solfataricus* cell samples collected in the different experimental conditions tested.

Based on a calibration curve established with a quantitative range of loaded purified recombinant protein of TopR1 or TopR2 spanning the signal intensity range detected in the different crude extracts, the number of each reverse gyrase per cell of *S. solfataricus* has been determined (Additional file 1: Figure S1). It is the first study evidencing a specific detection of two reverse gyrases present within the same organism. The quantification data shown in Figure 4C, represent the average of at least three independent experiments. We estimated that the immunodetection signal obtained for cells growing exponentially at 80°C (Figure 4A and 4B, lane 1) correspond to 54 ± 6 molecules of TopR1 and 127 ± 18 molecules of TopR2 per cell respectively (Figure 4C). The level of both reverse gyrases in actively dividing cells is very low, with TopR2 being roughly two-fold more abundant than TopR1. The low abundance of TopR1 and TopR2 in 80°C exponentially growing cells, is in agreement with the very low amount of corresponding transcripts previously reported [18]. To date, only one study has reported an impressive high abundance of reverse gyrase per cell of *S. solfataricus* (between 2×10^3 and 2×10^4 molecules per cell) but the estimation is very approximate and partly based on a comparison with the genome size of *E. coli*. In addition, there is no distinction between both reverse gyrases TopR1 and TopR2 [31]. Anyway our specific quantification data are not in agreement with this preliminary study.

It was proposed that the reverse gyrase of *Archeaoglobus fulgidus* acts as a heat-protective DNA chaperone *via* the formation of a complete protein coated DNA [23]. This role was effectively evidenced *in vitro* only with a high protein/DNA mass ratio of 10 and above [23]. Even if we assume that both reverse gyrases, TopR1 and TopR2, of *S. solfataricus* could perform a similar chaperone activity, the ~180 molecules of TopR1 and TopR2 regularly distributed along the chromosome would represent a protein/DNA mass ratio approximately 38-fold less important than that required in *in vitro* experiments. Thus, our results of quantification of reverse gyrase(s) *in vivo* are not consistent with the *in vitro* heat-protective DNA chaperone activity except if we effectively consider a specific recruitment of reverse gyrase on preferred sites such as damaged DNA sites as previously discussed [23]. The authors showed that the role of chaperone does not require the positive supercoiling activity. Similarly the recruitment of reverse gyrase with the chromatin fraction after UV irradiation is not dependent upon the enzymatic activity in *S. solfataricus* since the *in vitro* UV lesions inhibit the positive supercoiling activity and rather stabilize covalent enzyme-DNA complexes [43]. The damaged DNA bound reverse gyrase would maintain DNA in an

appropriate conformation in agreement with the action of the DNA repair machinery concomitantly or secondly recruited. As soon as the DNA damage (UV lesion or nick) is repaired by the appropriate partner, the reverse gyrase could directly dissociate from DNA or modify the linking number if necessary before DNA dissociation. Similarly our evidence of a low amount of reverse gyrase per cell (either TopR1 or TopR2) do not sustain the requirement of a saturating protein concentration for the unwinding activity of TopR1 of four-way DNA junctions [31].

By contrast there is a consistency between the amounts of reverse gyrase that we estimated *in vivo* and the renaturase activity evidenced in *in vitro* experiments (Hsieh and Plank 2006). Indeed the introduction of positive supercoils into DNA containing a bubble of denaturation or the annealing of complementary single strand DNA circles have been evidenced *in vitro* with a quite low protein/DNA mass ratio of 0.5 or 0.8 respectively (Hsieh and Plank 2006). These activities are in agreement with a thermoprotection of DNA *via* the positive supercoiling activity of reverse gyrase to limit the proportion of single strand regions at high temperature. It should be noted that all *in vitro* experiments that we referred to, have been performed with DNA substrate devoid of any other bound protein. However, *in vivo*, DNA stabilization is mainly due to the binding of chromatin proteins, such as Sul7d which inhibits the reverse gyrase activity [44]. On the contrary another DNA binding protein, SSB, stimulates both the DNA binding and the positive supercoiling reaction of reverse gyrase [24]. These results strengthen the implication of reverse gyrase in DNA repair and recombination.

When cells are transferred from 80°C to 45°C for three weeks, the reverse gyrase content is modified but differently between TopR1 and TopR2 (Figure 4A and 4B, respectively). There is a gradual decrease of TopR1 with time course following the down-shift (Figure 4C). The number of TopR1 per cell is roughly divided by a 3-fold or 5-fold factor after 7 and 14 days respectively before being almost undetectable after 21 days at 45°C (Figure 4C, conditions 2-4). By contrast, the amount of TopR2 per cell remains roughly constant during the entire time course at 45°C (Figure 4C, conditions 2-4). Since we noticed that the protein concentration in crude extracts is systematically 2-fold lower in cells transferred to 45°C compared to that in 80°C control cells, the number of TopR1 per cell is even lower when normalized to the total protein number and that of TopR2 per cell is proportionally 2-fold more important. The two-fold decrease of total proteins at 45°C probably reflects a balance between degradation, stability and basal synthesis for a selective

set of proteins. The disappearance of TopR1 might probably result from a specific degradation with a slow rate rather than a dilution due to successive divisions as no significant division occurs after the down shift to 45°C. By contrast the relative high amount of TopR2 maintained at 45°C over the three weeks, could result from a particularly efficient stability and/or a basal synthesis to maintain a constant amount per cell. The protein amount of the two reverse gyrases is regulated differently throughout this long term down shift experiment.

Because cells maintained at 45°C for 21 days are able to resume an active cell division when they are shifted back to 80°C, we wanted to check whether the initial amount of each reverse gyrase per cell is restored as well. After 24 hours back to 80°C, the amount of TopR1 per cell is increased while that of TopR2 per cell remains constant, corresponding to the respective amounts initially observed for control cells (Figure 4C, condition 5 compared with condition 1). These results clearly indicate that the ability of the cell to divide is correlated with an appropriate amount of both reverse gyrases, TopR1 and TopR2.

The disappearance of TopR1 observed *in vivo* in cells maintained at 45°C is in agreement with the absence of any enzymatic activity of TopR1 at the same temperature in *in vitro* assays (Figure 1A). Similarly the fact that TopR2 is still active at 45°C *in vitro* strengthens the biological relevance of its presence *in vivo* at the same low temperature (Figure 1B and 1C). TopR1 is therefore dispensable at 45°C while TopR2 might play an important role at low and high temperatures. TopR1 from *S. solfataricus* could be assimilated to the unique reverse gyrase present in *T. kodakaraensis* since the corresponding gene has been shown to be dispensable in this organism as long as the mutant is not submitted to too high temperatures [14]. Our results are also in agreement with the very low level of reverse gyrase transcripts at 45°C and the highly induced expression in *Nautilia profundicola*, a moderately thermophilic bacterium, when shifted from 45°C to 65°C for two hours [15]. Once again TopR1 from *S. solfataricus* could be the functional homologue of the unique reverse gyrase present in *N. profundicola* [15]. All these concordant results could illustrate that TopR1 and its homologues might play a role in life at high temperature and/or in thermoadaptation. If the TopR1 protein can be dispensable at 45°C in *S. solfataricus*, it is likely essential at temperatures consistent with growth since in a very close strain, *S. islandicus*, no viable mutant could be obtained [16].

Since we do not observe any quantitative variations of both TopR1 and TopR2 within a duration of 6 hours following the transfer from 80°C to 45°C (data not shown), the quantitative variations that we observe over a long time period, are directly related to the

reduced cell activity rather than to the temperature change. Indeed at 45°C, there is no cell division and no replication, but it might occur a reduced cell activity to maintain the different components required for the cell resistance at 45°C with a preserved membrane integrity and for the resumption of a normal cell activity when back to appropriate temperature conditions. When the cell activity is reduced, all DNA transaction processes are less active, and therefore there is no need to maintain a high control of the topological state of DNA. Because the absence of cell division is correlated with the absence of TopR1, which in addition does not exhibit any enzymatic activity at 45°C *in vitro*, it is tempting to propose that the role of TopR1 would be rather linked with a cell division activity at high temperature leading necessarily to frequent modifications of the topological state of DNA, that are important to solve constantly.

For TopR2, it was shown in the literature that the corresponding transcript level is increased during the G1/S transition phase, highlighting an important role of TopR2 in replication process [45]. In our studies, the TopR2 protein is present in actively dividing cells at 80°C and in non-dividing cells at 45°C. TopR2 could be implied in the residual activity of replication exhibited by cells containing 1-2 genome equivalent, observed during the 48h following the transfer at 45°C. Beyond this time period one might consider another role for TopR2 as no new replication round occur anymore. In order to allow the resumption of a normal cell activity when back to 80°C after three weeks at 45°C, it is essential to have preserved the genome stability. Without any precise evidence in the literature it is quite already a long time ago that reverse gyrase has been proposed to be involved in maintenance of genome stability [8, 29]. TopR2 being the unique reverse gyrase preserved in cells at 45°C could assume this function either by stabilizing specific regions of DNA or by participating to one or several DNA repair pathways. It has been shown *in vitro* that TopR1 from *S. solfataricus* inhibits the activity of the translesion DNA PolY (Dpo4), a DNA polymerase known to be involved in response to DNA damage [30]. This inhibition is mediated by a physical interaction between TopR1 and PolY/Dpo4 evidenced both *in vivo* and *in vitro*. However, it was mentioned that the anti-TopR1 antibodies used in this study recognized both TopR1 and TopR2. It is therefore not possible to clearly determine which reverse gyrase interacts with PolY/Dpo4 in *in vivo* co-immunoprecipitation experiments. Additionally the affinity of TopR1 for PolY/Dpo4 was shown to be essentially due to the topoisomerase domain rather than to the helicase domain. Interestingly, both topoisomerase domains from TopR1 and TopR2 of *S. solfataricus* are much more conserved than the corresponding helicase domains [32]. For these different reasons, we cannot actually exclude that TopR2

may also exhibit a significant affinity for PolY/Dpo4 with a similar or even higher range. If this hypothesis turns out correct, it would imply that in our study TopR2, being the unique remaining reverse gyrase at 45°C and present at the same level than for 80°C control cells, would be the unique reverse gyrase which inhibits Dpo4. At 80°C, TopR2 being two-fold more abundant than TopR1, a competition could occur depending on their respective affinities and possibly balanced by the different pathways in which the two reverse gyrases are specifically implied.

Besides, we cannot exclude that TopR2 could replace at least partially TopR1, especially because TopR2 still exhibits a residual activity of high positive supercoiling of DNA with a reduced processivity which can be relevant for the DNA topological regulation, even if it is at a low level.

In this report, we clearly demonstrate that *S. solfataricus* is able to resist to low temperature (45°C) over a long time, without dividing but containing two fully replicated genomes for the major part of the cell population. They are ready to resume a normal cell activity with active cell division as soon as favorable conditions are restored. This incredible property of “cold” resistance could favor the ability of *S. solfataricus* to be spread in new environments and could also explain how very distant ecological niches on the earth are occupied by closely related *Sulfolobus* strains [46]. We also evidenced that the two distinct reverse gyrases are not regulated in the same way and do not have the same function in the cells. In addition to our previous results [18, 32] we provide another clue for an important role of TopR1 in regulation of the supercoiling density of the genome in relation with cellular processes such as replication, transcription and recombination, particularly active in dividing cells at high temperature. By contrast, TopR2 would be rather associated with DNA replication and repair but mostly with genome stability. Indeed, TopR2 remains at a constant level in cells harboring two genomes, physiological status allowing to the homologous recombination to occur. However, additional studies will be necessary to decipher more deeply the role(s) of TopR2.

Conclusions

For the first time, we quantified the amount of reverse gyrase molecules per cell and when *S. solfataricus* is actively dividing at 80°C, there are approximately 50 molecules of TopR1 and 125 molecules of TopR2 per cell. At 45°C, *S. solfataricus* is able to adapt its reverse gyrase content: the level of TopR1 drastically decreases while that of TopR2 remains constant. The *in vivo* results are in agreement with the *in vitro* activity results. Indeed, TopR2 is still able to

perform a significant positive supercoiling activity at 45°C while TopR1 is no more active. TopR1 is dispensable at low temperature but required at high temperature and therefore probably involved in thermoadaptation and/or in different DNA transactions processes occurring when *S. solfataricus* cells are actively dividing at 80°C. By contrast TopR2 is present with a constant amount both at 80°C and 45°C suggesting that TopR2 might be at least involved in maintenance of genome stability, particularly upon a prolonged period at 45°C where the activity due to the DNA metabolism is decreased since no cell division and no replication is performed. In addition this implication of TopR2 in genome stability may possibly require its activity of positive supercoiling detected at 45°C in *in vitro* enzymatic assays.

Materials and Methods

Materials.

Tris, glycine, SDS, dimethylsulfoxid (DMSO), acrylamide and bis-acrylamide were purchased from Euromedex. Ponceau S, p-coumaric acid, bromophenol blue, brilliant blue R250, MgSO₄, Ca(NO₃)₂, COSO₄, CuCl₂, ZnSO₄, Na₂M₀O₄, Na₂B₄O₇, FeSO₄, VOSO₄, vitamins, gelrite gellan gum, HEPES, hydrogen peroxide, Tween 20, luminol, Triton X-100, sucrose, acetic acid, dithiothreitol (DTT), RNase A, propidium iodide (PI) were obtained from Sigma. KCl, H₂SO₄ and KH₂PO₄ were from Merck. NaCl was from Fischer scientific. Tryptone peptone and yeast extract were obtained from Difco (Becton Dickinson). Ammonium persulfate (APS), N,N,N',N'-tetra methyl ethylenediamine (TEMED), bovine serum albumin and Bradford reactif were purchased from BioRad. Propan-2-ol, ethanol, sorbitol, HCl, MgCl₂, MnCl₂ and (NH₄)₂SO₄ were from Prolabo. Glycerol was obtained from Acros organique.

Strain.

Sulfolobus solfataricus strain P2 (DSMZ 1617) was purchased from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig, Germany.

Reverse gyrase assays.

Enzymatic assays - The standard reaction mixture contained 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 20 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1.25 mM ATP and 0.15 μg of negatively supercoiled pTZ18R DNA. After addition of the purified enzymes [32] at a molar ratio topoisomerase/DNA of 4, the mixture was incubated at the indicated temperature for 20 min. Finally, the reaction was stopped by cooling on ice. 0.1% SDS, 25 mg/ml bromophenol blue and 15% sucrose were added before loading onto the agarose gel.

Mono-dimensional gel electrophoreses - Electrophoresis was performed in a 1.2% agarose gel at room temperature in a TEP buffer (36 mM Tris, 30 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7.8) and run at 3 V/cm for 6 h. The gel was washed in TEP buffer for 15 min, stained with ethidium bromide (2 μg/mL for 30 min) and digitalized under UV light.

Two-dimensional gel electrophoreses - The result of the TopR2 activity was analysed after a two-dimensional gel electrophoresis. The first dimension was performed at room temperature in a 1.2% agarose gel in TEP buffer at 3 V/cm for 150 min. After the first dimension, the gel was soaked for 30 min in TEP buffer containing 10 μg/mL chloroquin. The second dimension

was performed in the same buffer, perpendicularly to the first one, at 0.9 V/cm for 14 h. Before staining, the gel was washed in TEP buffer for 30 min.

Culture of *Sulfolobus solfataricus* P2 in liquid medium.

Sulfolobus solfataricus P2 cultures were performed as previously described [18]. Cells were cultivated either at 80°C or 45°C. The cell density was monitored by measuring the optical density at 600 nm (OD_{600nm}) and by flow cytometry. Cells cultivated at 80°C and having reached an exponential growth phase ($0.3 < OD_{600nm} < 0.6$) were transferred at 45°C and maintained at this low temperature for three weeks either continuously or resuspended every six days with fresh medium pre-heated at 45°C. After three weeks maintained at 45°C, the same cells were transferred back to 80°C.

Phase-contrast and fluorescence microscopy.

The *S. solfataricus* cell samples ($1.2 \cdot 10^9$ cells) were collected at 80°C before the shift to 45°C, at 45°C over a period of three weeks, and again at 80°C when cells were transferred back to 80°C after three weeks at 45°C. Cells were immediately centrifuged at room temperature at $5000 \times g$ for 5 min. The cells were washed with liquid medium then centrifuged at $10000 \times g$ for 6 min. Syto 9 and propidium iodide of the LIVE/DEAD *BacLight* bacterial viability kit (Molecular Probes) were diluted in liquid medium to a final concentration of $6,68 \mu M$ and $10 \mu M$ respectively and used to resuspend cell samples to a final concentration of 10^7 cells/ μl . Resuspensions were incubated 15 minutes at room temperature in the darkness. Cells were observed in a three-dimensional deconvolution microscope (DMIRE2; Leica) equipped with an HCxPL APO 100 \times oil CS objective, NA = 1.40 (Leica). The images were captured by a 10-MHz Cool SNAP_{HQ 2} CCD camera (Roper Instruments), with a Z-optical spacing of $0.2 \mu m$. METAMORPH software (Universal Imaging Corp.) was used to acquire Z-series, deconvolute or not Z-series and treat the images. For each condition, only one image with a sharp fluorescence among the different acquired undeconvoluted Z-series is shown. Whatever the cell sample, all the cells have incorporated one or both stains and at least 200 cells/sample were picked up to determine cell size and cell viability. A minimum of three independent measurements were performed for each condition.

Flow cytometry.

Aliquots of *S. solfataricus* cells were fixed by adding five volumes of ethanol 70 % per volume of sample. Before analysis, cells were diluted with ethanol 70 % to obtain a final

concentration of 10^8 cells/ml. Cells were then washed twice with TE (10 mM Tris-HCl pH 7.4 and 10 mM EDTA pH 8) by centrifugation at 4°C at $10000 \times g$ for 6 min. Samples were kept at 4°C during all steps. Cells were then resuspended with TE containing RNase A ($10 \mu\text{g/ml}$) to maintain final concentration of 10^8 cells/ml. Cell preparations were incubated at 37°C for 120 min and centrifuged at 4°C at $10000 \times g$ for 6 min. Cells were resuspended in the same volume of TE containing propidium iodide ($10 \mu\text{g/ml}$) and kept at 4°C over-night in the darkness before analysis. The analysis was performed with PAS III Partec Flow cytometer. Details of the procedure were performed as previously described [47]. Results are shown as representations of combined light scatter (FSC) and DNA content distributions.

Crude extract preparation.

Cell samples ($8.25 \cdot 10^9$ cells) were collected as described for microscopy but were cooled immediately on ice, and then centrifuged at 4°C at $5000 \times g$ for 5 min. The cells were washed twice with buffer containing 20 mM HEPES and 1 M sorbitol then centrifuged at 4°C at $10000 \times g$ for 6 min. The cells were resuspended to a final cell concentration of $4 \cdot 10^{10}$ cells/ml in extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 7, 15 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 400 mM sorbitol) and were gently disrupted by the addition of 0.5 % Triton X-100 and by a moderate agitation for 15 min at 4°C . Protein concentrations of crude extracts were estimated by the Bradford method with bovine serum albumin as the standard. Before loading onto gel, protein aliquots were denatured with Laemmli buffer and heated at 95°C for 5 min.

Detection of reverse gyrases.

Primary antibodies were made by Eurogentec against two specific epitopes of each reverse gyrase of *S. solfataricus*: PRILYNKQSPTQTEN and EDIQTMMKLLRENIG for anti-TopR1 and GRSKLNKKYVEDL and YFSEKRKVEEYINNL for anti-TopR2. The choice of these epitopes was based on both the amino acid sequences deduced from the genome of *S. solfataricus* [48] and the structure of reverse gyrase published [49]. Corresponding peptides were synthesized, linked to hemocyanine and used to immunize rabbits. Proteins were separated by using SDS-PAGE (10 % acrylamide / 0.13 % bis-acrylamide). Proteins were further electroblotted onto a nitrocellulose membrane (Whatman Protran BA79) for 1 hour at 4°C in transfer buffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 15 % propan-2-ol). Membranes were stained with Ponceau S, washed with TBS -Tween buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 13.7 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) and blocked with 3 % milk in TBS-Tween. Membranes were then probed over-night at 4°C with either $1/6000^\circ$ anti-TopR1 antibodies or $1/4000^\circ$ anti-

TopR2 antibodies. Membranes were then washed with TBS-Tween and probed for 1 hour at 4°C with 1/20000^e horseradish-peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG from donkey (GE Healthcare). All dilutions of antibodies were performed with TBS-Tween. The immunodetection was visualized with ECL mix (100 mM Tris-HCl pH 8.45, 0.009 % H₂O₂, 0.225 mM p-coumaric acid, 1.25 mM luminol). The chemiluminescence and Ponceau S signals were captured using a CCD camera (Image Quant LAS 4000, GE Healthcare) and the acquisitions were analyzed with ImageQuant TL (v 7.0) package.

Estimation of TopR1 and TopR2 number per *S. solfataricus* cell.

To determine the amount of the two reverse gyrases present in various crude extracts of *S. solfataricus*, we established a relation between ECL signal intensity and the quantity of reverse gyrases. To do so, the two purified recombinant TopR1 and TopR2 [32] were used as standards and the corresponding ECL signal intensity obtained for each loaded amount (from 0.3 to 50 ng) was used to establish a calibration curve. Then, the ECL signal intensity obtained for various crude extracts for each condition was compared with the TopR1 and TopR2 calibration curves respectively (additional file 1: Figure S1) and converted into the corresponding amount of reverse gyrase. This quantification of reverse gyrase was performed with membranes for which the Ponceau S staining was homogeneous between the different loaded crude extracts. To estimate the number of copies of reverse gyrase per cell, we used the theoretical molecular weight of the corresponding reverse gyrase. The quantification data result from at least three independent experiments.

Authors' contributions

MC carried out cell cultures, western blot, microscopy and flow cytometry, helped to draft the manuscript and participated to the design of the study.

AB carried out the reverse gyrase assays at the different temperatures.

FG participated to the design the antibodies and to finalize western blot methods, participated to the design of the study and its coordination and drafted the manuscript.

MN participated to the design the antibodies and to finalize western blot methods, participated to the design of the study and its coordination and drafted the manuscript.

All the authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by CNRS and EDF (RB-2003-16).

We thank Magali Prigent for her help in fluorescent microscopy and Jean-Luc Ferat for his help in flow cytometer experiments experiments. We thank H el ene D ebat, Florence Constantinesco, Christiane Elie, Adrienne Kish and Martine Mathieu for helpful discussions.

We are indebted to Patrick Forterre for support during this work.

References

1. Champoux JJ: **DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism.** *Annu Rev Biochem* 2001, **70**:369–413.
2. Chen SH, Chan N-L, Hsieh T-S: **New Mechanistic and Functional Insights into DNA Topoisomerases.** *Biochemistry* 2013:–.
3. Forterre P, Mirambeau G, Jaxel C, Nadal M, Duguet M: **High positive supercoiling in vitro catalyzed by an ATP and polyethylene glycol-stimulated topoisomerase from Sulfolobus acidocaldarius.** *EMBO J* 1985, **4**:2123–2128.
4. Nakasu S, Kikuchi A: **Reverse gyrase; ATP-dependent type I topoisomerase from Sulfolobus.** *EMBO J* 1985, **4**:2705–2710.
5. Nadal M, Jaxel C, Portemer C, Forterre P, Mirambeau G, Duguet M: **Reverse gyrase of Sulfolobus: purification to homogeneity and characterization.** *Biochemistry* 1988, **27**:9102–9108.
6. Confalonieri F, Elie C, Nadal M, Bouthier de La Tour C, Forterre P, Duguet M: **Reverse Gyrase: A Helicase-Like Domain and a Type 1 Topoisomerase in the Same Polypeptide.** *Volume 90*; 1993:4753–4757.
7. Jaxel C, Bouthier de la Tour C, Duguet M, Nadal M: **Reverse gyrase gene from Sulfolobus shibatae B12: gene structure, transcription unit and comparative sequence analysis of the two domains.** *Nucleic Acids Res* 1996, **24**:4668–4675.
8. Nadal M: **Reverse gyrase: an insight into the role of DNA-topoisomerases.** *Biochimie* 2007, **89**:447–455.
9. Bouthier de la Tour C, Portemer C, Nadal M, Stetter KO, Forterre P, Duguet M: **Reverse gyrase, a hallmark of the hyperthermophilic archaeobacteria.** *J Bacteriol* 1990, **172**:6803–6808.
10. Bouthier de la Tour C, Portemer C, Huber R, Forterre P, Duguet M: **Reverse gyrase in thermophilic eubacteria.** *J Bacteriol* 1991, **173**:3921–3923.
11. Forterre P: **A hot topic: the origin of hyperthermophiles.** *Cell* 1996, **85**:789–792.
12. Brochier-Armanet C, Forterre P: **Widespread distribution of archaeal reverse gyrase in thermophilic bacteria suggests a complex history of vertical inheritance and lateral gene transfers.** *Archaea* 2007, **2**:83–93.
13. Forterre P: **A hot story from comparative genomics: reverse gyrase is the only hyperthermophile-specific protein.** *Trends Genet* 2002, **18**:236–237.
14. Atomi H, Matsumi R, Imanaka T: **Reverse gyrase is not a prerequisite for hyperthermophilic life.** *J Bacteriol* 2004, **186**:4829–4833.
15. Campbell BJ, Smith JL, Hanson TE, Klotz MG, Stein LY, Lee CK, Wu D, Robinson JM, Khouri HM, Eisen JA, Cary SC: **Adaptations to submarine hydrothermal environments exemplified by the genome of Nautilia profundicola.** *PLoS Genet* 2009, **5**:e1000362.
16. Zhang C, Tian B, Li S, Ao X, Dalgaard K, Gökce S, Liang Y, She Q: **Genetic manipulation in Sulfolobus islandicus and functional analysis of DNA repair genes.** *Biochem Soc Trans* 2013, **41**:405–410.
17. Liu LFL, Wang JCJ: **Supercoiling of the DNA template during transcription.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, **84**:7024–7027.
18. Garnier F, Nadal M: **Transcriptional analysis of the two reverse gyrase encoding genes of Sulfolobus solfataricus P2 in relation to the growth phases and temperature conditions.** *Extremophiles* 2008, **12**:799–809.

19. Dai P, Wang Y, Ye R, Chen L, Huang L: **DNA topoisomerase III from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* with specific DNA cleavage activity.** *J Bacteriol* 2003, **185**:5500–5507.
20. Valenti A, De Felice M, Perugino G, Bizard A, Nadal M, Rossi M, Ciaramella M: **Synergic and Opposing Activities of Thermophilic RecQ-like Helicase and Topoisomerase 3 Proteins in Holliday Junction Processing and Replication Fork Stabilization.** *J Biol Chem* 2012, **287**:30282–30295.
21. Bergerat AA, Gadelle DD, Forterre PP: **Purification of a DNA topoisomerase II from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae*. A thermostable enzyme with both bacterial and eucaryal features.** *J Biol Chem* 1994, **269**:27663–27669.
22. Nadal M, Mirambeau G, Forterre P, Reiter WD, Duguet M: **Positively Supercoiled Dna in a Virus-Like Particle of an Archaeobacterium.** *Nature* 1986, **321**:256–258.
23. Kampmann M, Stock D: **Reverse gyrase has heat-protective DNA chaperone activity independent of supercoiling.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:3537–3545.
24. Napoli AA, Valenti AA, Salerno VV, Nadal MM, Garnier FF, Rossi MM, Ciaramella MM: **Functional interaction of reverse gyrase with single-strand binding protein of the archaeon *Sulfolobus*.** *Nucleic Acids Res* 2004, **33**:564–576.
25. Hsieh T-S, Plank JL: **Reverse gyrase functions as a DNA renaturase: annealing of complementary single-stranded circles and positive supercoiling of a bubble substrate.** *J Biol Chem* 2006, **281**:5640–5647.
26. Gangloff S, McDonald JP, Bendixen C, Arthur L, Rothstein R: **The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase.** *Mol Cell Biol* 1994, **14**:8391–8398.
27. Harmon FG, DiGate RJ, Kowalczykowski SC: **RecQ helicase and topoisomerase III comprise a novel DNA strand passage function: a conserved mechanism for control of DNA recombination.** *Mol Cell* 1999, **3**:611–620.
28. Mankouri HW, Hickson ID: **The RecQ helicase-topoisomerase III-Rmi1 complex: a DNA structure-specific 'dissolvasome'?** *Trends Biochem Sci* 2007, **32**:538–546.
29. Perugino G, Valenti A, D'amaro A, Rossi M, Ciaramella M: **Reverse gyrase and genome stability in hyperthermophilic organisms.** *Biochem Soc Trans* 2009, **37**:69–73.
30. Valenti A, Perugino G, Nohmi T, Rossi M, Ciaramella M: **Inhibition of translesion DNA polymerase by archaeal reverse gyrase.** *Nucleic Acids Res* 2009.
31. Valenti A, Perugino G, Varriale A, D'Auria S, Rossi M, Ciaramella M: **The archaeal topoisomerase reverse gyrase is a helix-destabilizing protein that unwinds four-way DNA junctions.** *J Biol Chem* 2010, **285**:36532–36541.
32. Bizard A, Garnier F, Nadal M: **TopR2, the Second Reverse Gyrase of *Sulfolobus solfataricus*, Exhibits Unusual Properties.** *J Mol Biol* 2011, **408**:839–849.
33. Lübben M, Schäfer G: **Chemiosmotic energy conversion of the archaeobacterial thermoacidophile *Sulfolobus acidocaldarius*: oxidative phosphorylation and the presence of an F0-related N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-binding proteolipid.** *J Bacteriol* 1989, **171**:6106–6116.
34. Bell SD, Jaxel C, Nadal M, Kosa PF, Jackson SP: **Temperature, template topology, and factor requirements of archaeal transcription.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:15218–15222.
35. Lin H-KH, Chase SFS, Laue TMT, Jen-Jacobson LL, Trakselis MAM: **Differential temperature-dependent multimeric assemblies of replication and repair polymerases on DNA increase processivity.** *Biochemistry* 2012, **51**:7367–7382.

36. Mirambeau G, Duguet M, Forterre P: **Atp-Dependent Dna Topoisomerase From the Archaeobacterium Sulfolobus-Acidocaldarius - Relaxation of Supercoiled Dna at High-Temperature.** *J Mol Biol* 1984, **179**:559–563.
37. Hjort K, Bernander R: **Changes in Cell Size and DNA Content in Sulfolobus Cultures during Dilution and Temperature Shift Experiments.** *J Bacteriol* 1999, **181**:5669–5675.
38. Boulos LL, Prévost MM, Barbeau BB, Coallier JJ, Desjardins RR: **LIVE/DEAD BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water.** *J Microbiol Methods* 1999, **37**:77–86.
39. Leuko S, Legat A, Fendrihan S, Stan-Lotter H: **Evaluation of the LIVE/DEAD BacLight kit for detection of extremophilic archaea and visualization of microorganisms in environmental hypersaline samples.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:6884–6886.
40. Bernander R, Poplawski A: **Cell cycle characteristics of thermophilic archaea.** *J Bacteriol* 1997.
41. Hjort K, Bernander R: **Changes in Cell Size and DNA Content in Sulfolobus Cultures during Dilution and Temperature Shift Experiments.** *J Bacteriol* 1999.
42. De Rosa M, Gambacorta A, Nicolaus B, Sodano S, Bu'lock JD: **Structural regularities in tetraether lipids of Caldariella and their biosynthetic and phyletic implications.** *Phytochemistry* 1980, **19**:833–836.
43. Napoli A, Valenti A, Salerno V, Nadal M, Garnier F, Rossi M, Ciaramella M: **Reverse gyrase recruitment to DNA after UV light irradiation in Sulfolobus solfataricus.** *J Biol Chem* 2004, **279**:33192–33198.
44. Napoli A, Zivanovic Y, Bocs C, Buhler C, Rossi M, Forterre P, Ciaramella M: **DNA bending, compaction and negative supercoiling by the architectural protein Sso7d of Sulfolobus solfataricus.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**:2656–2662.
45. Lundgren M, Bernander R: **Genome-wide transcription map of an archaeal cell cycle.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**:2939–2944.
46. Belly RT, Brock TD: **Cellular stability of a thermophilic, acidophilic mycoplasma.** *J Gen Microbiol* 1972, **73**:465–469.
47. Saifi B, Ferat J-L, Marinus MG: **Replication Fork Reactivation in a dnaC2 Mutant at Non-Permissive Temperature in Escherichia coli.** *PLoS ONE* 2012, **7**:3613.
48. She QQ, Singh RKR, Confalonieri FF, Zivanovic YY, Allard GG, Awayez MJM, Chan-Weiher CCC, Clausen IGL, Curtis BAB, De Moors AA, Erauso GG, Fletcher CC, Gordon PMP, Jong IHH-D, Jeffries ACA, Kozera CJC, Medina NN, Peng XX, Thi-Ngoc HPH, Redder PP, Schenk MEM, Theriault CC, Tolstrup NN, Charlebois RLR, Doolittle WFW, Duguet MM, Gaasterland TT, Garrett RAR, Ragan MAM, Sensen CWC, et al.: **The complete genome of the crenarchaeon Sulfolobus solfataricus P2.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:7835–7840.
49. Rodríguez AC, Stock D: **Crystal structure of reverse gyrase: insights into the positive supercoiling of DNA.** *EMBO J* 2002, **21**:418–426.

Figure legends

Figure 1. Effect of low temperature on the reactions catalysed by TopR1 and TopR2.

Standard positive supercoiling reactions were performed at a molecular ratio of 4 in the presence of TopR1 (A) or in the presence of TopR2 (B and C). The reaction products were analysed by mono-dimensional gel electrophoresis (A and B) and also by two-dimensional gel electrophoresis for TopR2 (C). For panels A, B and C, the incubation temperature is 45°C for lanes 1, 50°C for lanes 2, 55°C for lanes 3, 60°C for lanes 4, 65°C for lanes 5, 70°C for lanes 6, 75°C for lanes 7 and 80°C for lanes 8. The lane 9 in panel A is the negatively supercoiled DNA substrate incubated in the absence of enzyme. Pictures in panel C below the 2D gels schematize the position of the different forms of DNA in 2D gel electrophoresis.

Figure 2. Transfer of *S. solfataricus* cells from 80°C to 45°C for three weeks and back to 80°C.

Cell samples were collected either from cells growing exponentially at 80°C (0h), or after being transferred to 45°C (time points: 7d, 14d and 21d), or transferred back to 80°C (24h) respectively. The cell density was monitored by measuring the OD_{600nm} (A) and by flow cytometry (D). The time point (0h) indicates when 80°C exponentially growing cells (closed grey diamond) were transferred from 80°C to 45°C (open black diamond). The arrow (†) indicates when cells were transferred back to 80°C (closed grey diamond) after 21 days at 45°C. (B) Cell size is analyzed by phase-contrast (a-e). Bar, 2 μm. (C) Cell membrane integrity is analyzed by fluorescence microscopy. Merged images of Syto 9 (green) and propidium iodide (red) are shown (a-e). The same cells are observed by phase-contrast (B) and by fluorescence microscopy (C). DNA content distribution of *S. solfataricus* cells transferred from 80°C to 45°C for three weeks and back to 80°C (D). DNA content distribution was analysed by flow cytometry (a-e).

Figure 3. Specificity of the antibodies raised against each reverse gyrase of *S. solfataricus*.

Western blot analysis of recombinant proteins TopR1 and TopR2 of *S. solfataricus* in lanes 1 and 2, respectively, and of *S. solfataricus* crude extracts in lane 3. Lanes 1-3 were probed with either a serum anti-TopR1 diluted at 1/6000^e (A) or a serum anti-TopR2 diluted at 1/4000^e (B). (C) corresponds to *S. solfataricus* crude extracts directly incubated with secondary antibodies. Molecular weight standards in kDa (Kaleidoscope, BioRad) are indicated between panels A and B. Lanes 1 from panels A and B contain 0.3 ng and 50 ng of the recombinant TopR1 respectively. Lanes 2 from panels A and B correspond

to 50 ng of the recombinant TopR2. Lane 3 from panel A and lanes 3 from panels B and C contain 10 μg and 50 μg of *S. solfataricus* crude extracts respectively. Asterisks indicate the detection of TopR1 and TopR2 in crude extracts.

Figure 4. Reverse gyrase content in *S. solfataricus* cells. Protein crude extracts were prepared from cells growing exponentially at 80°C (lane 1), transferred to 45°C for 7 days (lane 2), 14 days (lane 3) and 21 days (lane 4) or back to 80°C for 24 hours (lane 5). 10 μg and 50 μg of crude extract were loaded for detection of TopR1 and TopR2 respectively. Corresponding western blots obtained with either anti-TopR1 (**A**) or anti-TopR2 (**B**) antibodies are shown. The corresponding quantification of the specific signals is expressed as the number of TopR molecule per cell and shown in panel C.

Additional file 1: Figure S1. Calibration curves of recombinant proteins TopR1 and TopR2. The two purified recombinant TopR1 and TopR2 of *S. solfataricus* were used as standards and corresponding western blots obtained with either anti-TopR1 (**A**) or anti-TopR2 (**B**) antibodies are shown. Calibration curves, **C** and **D**, were generated by plotting the ECL signal intensity obtained for each loaded amount of the purified recombinant TopR1 (from 0.3 to 1.2 ng) and the purified recombinant TopR2 (from 12.5 to 50 ng) respectively. The ECL signal intensity obtained for each crude extract being comprised in the range of the ECL signal intensity obtained for the three amounts of the two purified recombinant TopR, only these three points are shown in this figure.

Figure 1

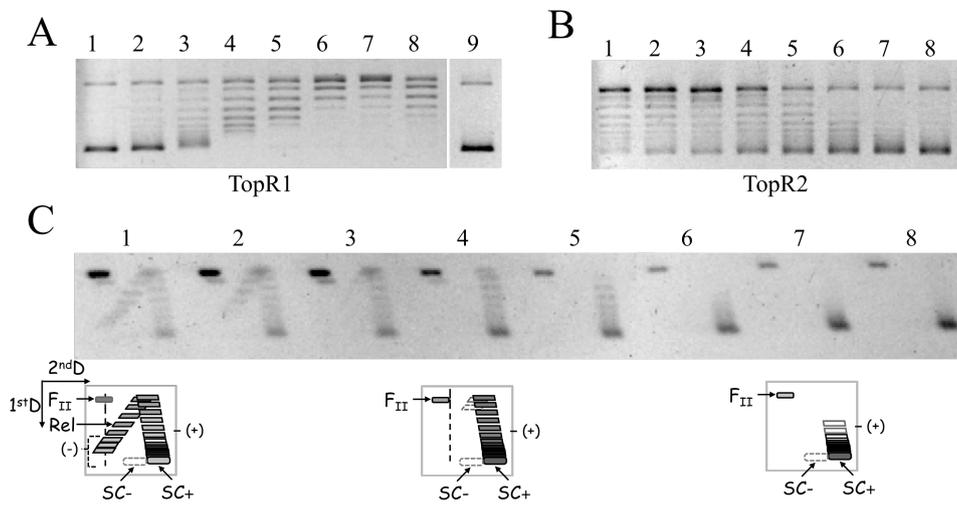


Figure 2

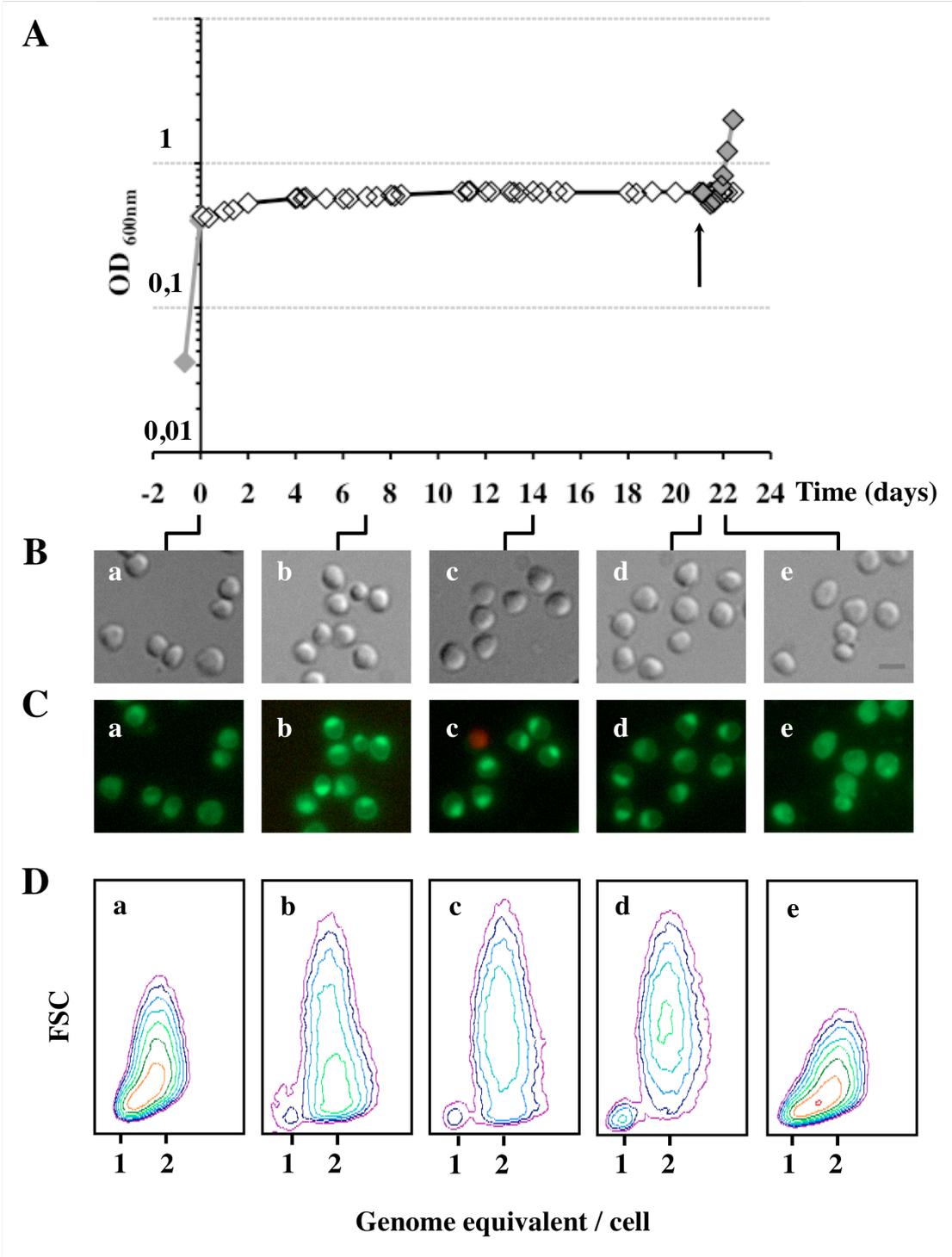


Figure 3

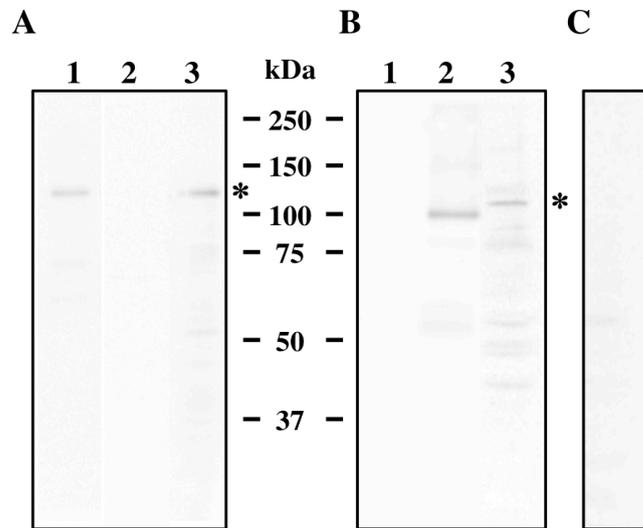
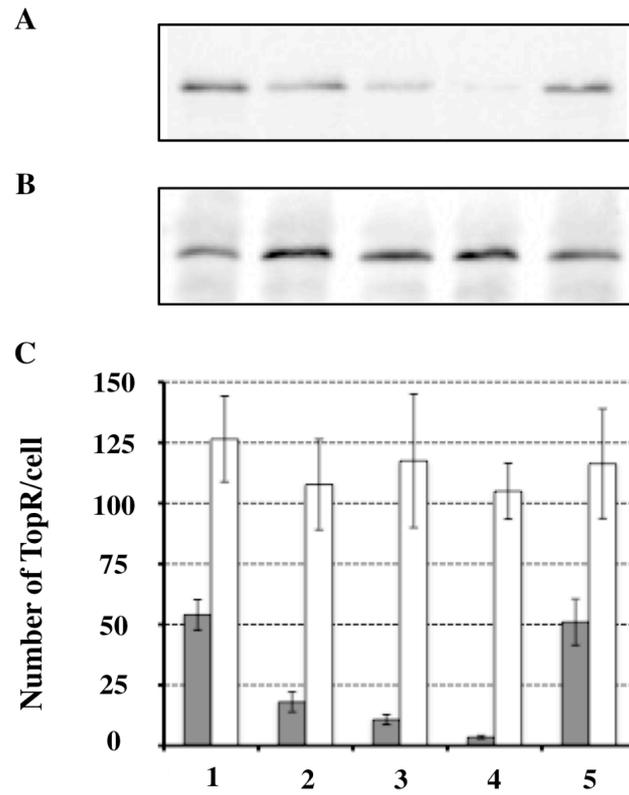
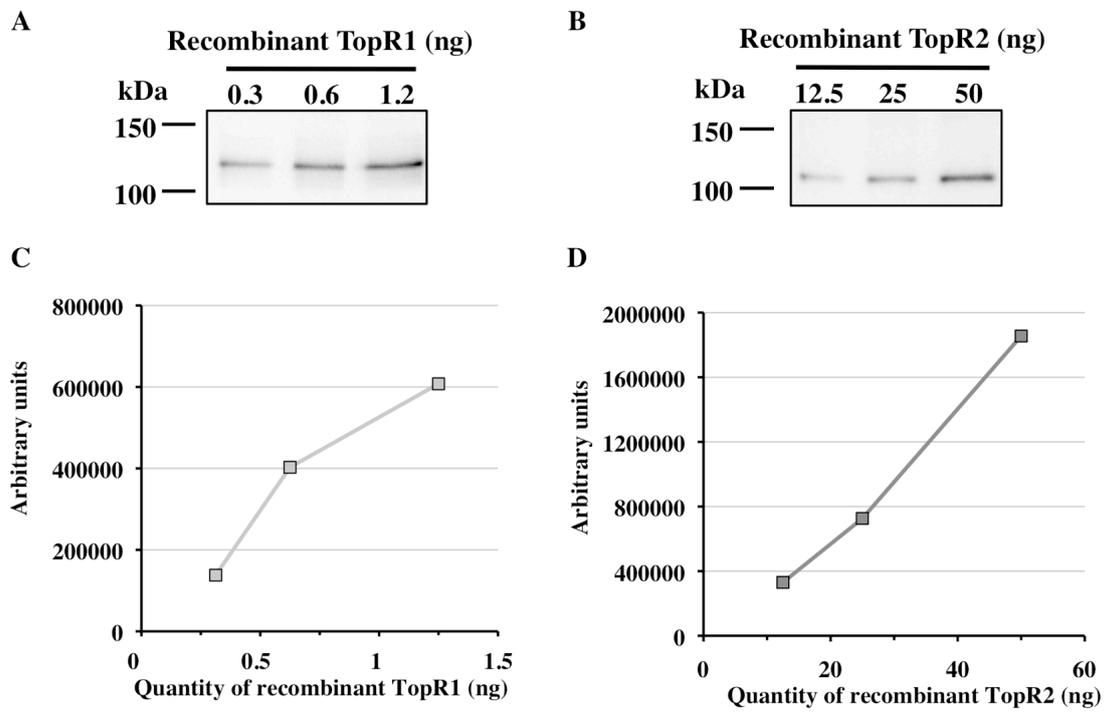


Figure 4



Additional file 1



IV- Résultats complémentaires

Recherche des partenaires protéiques des deux reverse gyrases

Comme nous l'avons déjà évoqué, la régulation des activités d'une protéine s'effectue le plus souvent *via* des partenaires protéiques. Nous avons d'ailleurs mentionné plusieurs exemples dans l'introduction de cette thèse, notamment pour la reverse gyrase de *S. solfataricus*. En effet, il a été montré que la protéine SSB, impliquée dans la réparation de l'ADN chez les archées hyperthermophiles, stimule l'activité d'introduction de supertours positifs de la reverse gyrase (Napoli *et al.*, 2005). Cette même activité inhibe, entre autre, la polymérase translésionnelle Dpo4 (Valenti *et al.*, 2009). Il a également été montré que la reverse gyrase de *S. solfataricus*, suite à l'ajout d'un agent alkylant (le MMS), est spécifiquement dégradée par une métalloprotéase (Valenti *et al.*, 2006).

Toutes ces études mettent en évidence l'implication plus ou moins directe de la reverse gyrase de *S. solfataricus* dans la réparation de l'ADN. Pour autant malgré l'intérêt crucial de distinguer les différents rôles assumés par chacune des deux reverses gyrases, toutes les études menées jusqu'à présent sont incapables de distinguer les deux ou ne ciblent que la reverse gyrase TopR1. Dans le cas de l'étude de l'inhibition de la polymérase translésionnelle (Valenti *et al.*, 2009), les auteurs travaillent avec une forme recombinante de la protéine TopR1 couplée à une étiquette histidine qu'ils ont utilisée pour obtenir des anticorps. Toutefois, ces anticorps reconnaissent non seulement la protéine TopR1 recombinante mais également les deux reverse gyrases endogènes TopR1 et TopR2 (Valenti *et al.*, 2009). Ainsi, si l'inhibition de la polymérase translésionnelle par TopR1 a clairement été établie *in vitro* et confirmée *in vivo*, il n'est pas du tout exclu que TopR2 puisse également avoir cette fonction en ayant été co-immunoprécipitée lors des expériences *in vivo*.

Au laboratoire, nous disposons des anticorps spécifiquement dirigés contre TopR1 et TopR2 de *S. solfataricus* ce qui peut nous permettre d'étudier leurs réseaux d'interactions respectifs et ainsi de mieux cerner leurs implications cellulaires respectives. Pour ce faire, nous avons entrepris de mettre au point un protocole d'immuno-précipitation en utilisant, dans un premier temps les anticorps anti-TopR1, ainsi que des billes magnétiques recouvertes de protéines chimériques présentant à la fois les domaines des protéines A et G et permettant ainsi une liaison très spécifique d'un grand nombre d'Immuno-Globulines (Ademtech : Bio-Adembeads PAG).

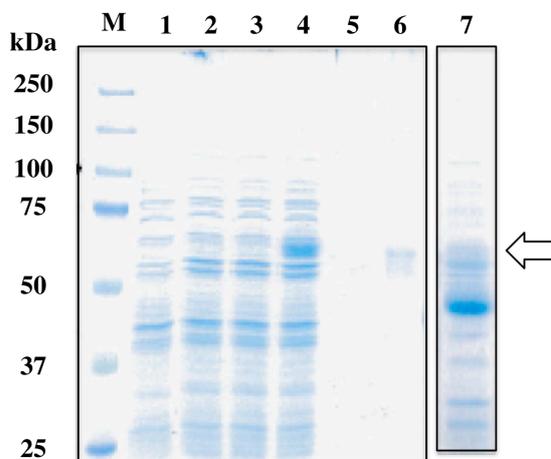
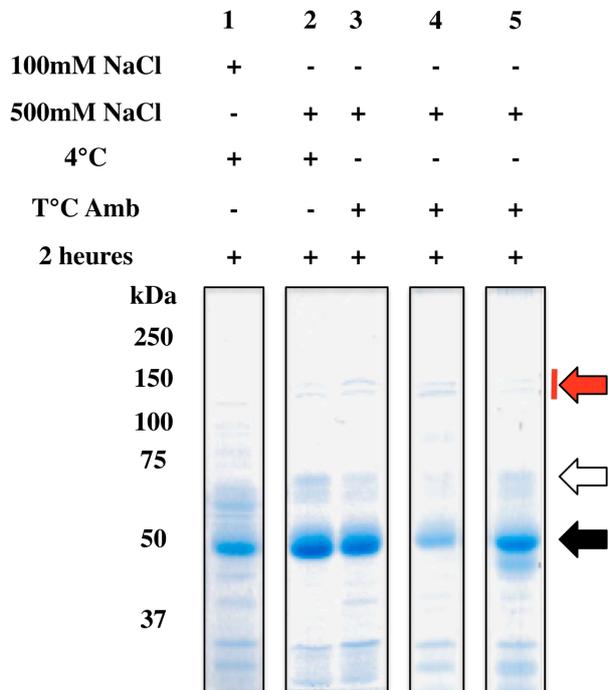
A**B**

Figure 29- Visualisation des profils protéiques au cours des différentes étapes de l'immuno-précipitation après migration sur gel SDS-PAGE (10%) coloré au bleu de Coomassie.

(A) Pour contrôler la procédure de sonication, des extraits protéiques totaux issus de cellules de *S. solfataricus* cultivés à 80°C en phase exponentielle et obtenus par lyse douce ont été déposés (piste 1) et sont à comparer aux extraits protéiques totaux obtenus après sonication (piste 2). Après sonication, l'échantillon est soumis à une centrifugation et un aliquot du surnageant correspondant aux protéines solubles est déposé (piste 3). Après incubation des protéines solubles en présence des anticorps anti-TopR1 et des billes magnétiques, un aliquot protéique de la fraction non retenue sur les billes a été déposé (piste 4). Un aliquot de tampon de lyse est déposé piste 5. Un aliquot de l'éluat obtenu après élution des billes magnétiques en présence du tampon de lyse est déposé en piste 6 (les billes magnétiques n'ont pas été pré-incubées ni en présence d'un extrait total de *S. solfataricus*, ni en présence d'anticorps anti-TopR1). L'éluat obtenu après immuno-précipitation avec les anticorps anti-TopR1 incubés à 4°C pendant 2h et en présence d'une force ionique de 100 mM est déposé piste 7. Pour chaque fraction protéique un volume de 2µl d'échantillons est déposé dans les différentes pistes.

(B) Comparaison des éluats obtenus à l'issue d'une immuno-précipitation réalisée dans 3 conditions différentes. Les 3 conditions différentes testées sont les suivantes : la force ionique (100 mM, piste 1 ; 500 mM, piste 2), la température d'incubation (4°C, pistes 1 et 2 ; température ambiante, pistes 3-5) et la durée de formation du complexe Ag-Ac (2h, pistes 1-5). Les éluats obtenus après immuno-précipitation avec les anticorps anti-TopR1 sont déposés dans les pistes 1 à 4 ; un éluat obtenu après immuno-précipitation avec les anticorps anti-TopR2 est déposé piste 5. Les différentes flèches marquent les positions électrophorétiques des IgG (flèche noire), un composant artefactuel relargué après élution des billes (flèche blanche) et les protéines d'intérêt pouvant être TopR1 ou TopR2 ou d'autres protéines (flèche rouge).

Pour réaliser nos différents essais d'immuno-précipitation, nous partons de cellules de *S. solfataricus* en phase exponentielle à 80°C. Celles-ci sont lysées par sonication et les protéines solubles sont récupérées. Les conditions expérimentales sont présentées dans la légende de la Figure 29. En premier lieu, nous nous sommes assurés que les conditions de sonication permettaient une bonne lyse des cellules ce qui est le cas puisque le profil protéique des protéines totales obtenu par lyse douce est similaire à celui obtenu après sonication (Figure 29A, piste 1 comparée à la piste 2). Ensuite, le profil protéique des protéines solubles est similaire à celui obtenu après sonication ce qui suggère que nous récupérons un grand nombre de protéines cytosoliques (Figure 29A, piste 3 comparée à la piste 2). Pour la formation du complexe antigène-anticorps-billes (Ag-Ac-B) nous avons opté pour la formation du complexe (Ag-Ac) en premier puis nous avons ajouté les billes au tampon réactionnel. Après incubation de l'échantillon avec les billes, le profil protéique correspondant aux protéines cytosoliques non retenues par les billes (Figure 29A, piste 4) est similaire aux différents profils précédents en termes d'intensité globale. Toutefois, il est intéressant de noter que le profil de la fraction des protéines cytosoliques non retenues par les billes ne contient pas de bandes électrophorétiques de forte intensité aux alentours de 50 kDa pouvant correspondre aux IgG (Figure 29A, piste 4). Cela semble suggérer que les billes fixent efficacement les anticorps anti-TopR1. La comparaison des profils protéiques obtenus en piste 5 (tampon de lyse) et piste 6 (élution des billes n'ayant été incubées qu'en présence du tampon de lyse) indique que la bande électrophorétique migrant aux alentours de 70 kDa et marquée d'une flèche blanche correspond vraisemblablement aux protéines A/G relarguées par les billes lors de l'élution (Figure 29). Il faudra donc en tenir compte lors de l'analyse des éluats obtenus après ajout des protéines solubles et des anticorps puisque cette bande est observée dans chacun des éluats déposés à la Figure 29. Le profil protéique de l'éluat obtenu en conditions de basse force ionique (100 mM NaCl) (Figure 29A, piste 7 et 29B, piste 1) présente un certain nombre de bandes électrophorétiques retrouvées dans les fractions protéiques totales ou cytosoliques montrant ainsi que ce protocole n'est pas suffisamment discriminant pour accéder aux différentes protéines potentiellement co-immuno-précipitées par les anticorps anti-TopR1. De plus, aucune bande électrophorétique correspondant à la masse moléculaire apparente de TopR1 (entre 100 et 150 kDa) n'est observée. Ce protocole ne semble donc pas optimal pour accéder aux différentes protéines potentiellement co-immuno-précipitées par les anticorps anti-TopR1 ni pour isoler TopR1.

Dans la poursuite de la mise au point du protocole d'immuno-précipitation, nous avons donc modifié trois conditions expérimentales afin d'augmenter la spécificité de l'immuno-précipitation vis-à-vis des reverse gyrases de *S. solfataricus* : la stringence de l'immuno-précipitation a été augmentée en modulant la force ionique du tampon de lyse, la température et enfin le temps d'incubation lors de la formation des complexes (Ag-Ac) et (Ag-Ac-B).

En ce qui concerne la durée de formation des différents complexes, nous avons testé 2 heures et 24 heures. Etant donné que l'incubation de 24 heures ne permet pas d'augmenter le rendement de TopR1 co-immuno-précipité par rapport à celui obtenu lors d'une incubation de 2 heures, nous ne montrons que les résultats obtenus avec une incubation pendant 2 heures (Figure 29B). Pour chacune des conditions testées et pour chaque éluat déposé, une bande électrophorétique migrant aux alentours de 50 kDa marquée par une flèche noire est isolée (Figure 29B). Cette bande correspond aux IgG fixées sur les billes magnétiques (Figure 29B).

La comparaison du profil protéique de l'éluat obtenu en conditions de forte force ionique (500 mM NaCl, Figure 29B, piste 2) et de celui obtenu en conditions de basse force ionique (100 mM NaCl, Figure 29B, piste 1) permet de constater que nous améliorons de manière très significative l'isolement de bandes protéiques migrant entre 100 et 150 kDa (signalées par la flèche rouge dans la figure 29B) en augmentant la concentration en sels du tampon de lyse. Il est possible qu'au moins une de ces deux bandes contienne TopR1 puisque sa masse moléculaire apparente est compatible. Mais il n'est pas exclu, du fait que TopR1 soit en très faible quantité dans les cellules, que ces bandes électrophorétiques visualisées sur gel correspondent à d'autres protéines de masses moléculaires apparentes comprises entre 100 et 150 kDa. La vérification par immuno-détection a été réalisée mais nous sommes dans l'incapacité de détecter un signal significatif à cette position électrophorétique (non montré). La teneur en Immuno-globulines est tellement importante (10 μ l d'anticorps pour 100 μ l de billes) que la migration s'en retrouve perturbée limitant ainsi l'interprétation. Aussi, pour s'assurer qu'il s'agisse bien de TopR1, il est envisagé d'identifier par spectrométrie de masse les protéines correspondant à ces bandes électrophorétiques. Toutefois, il est clair qu'il est préférable de mener l'expérience de co-immuno-précipitation en conditions de forte force ionique (500 mM) afin de limiter les associations aspécifiques et d'enrichir en contre-partie l'éluat en TopR1 et en partenaires protéiques potentiels.

Nous avons ensuite modifié la température d'incubation pour la formation des différents complexes protéiques. D'après les résultats obtenus, l'incubation menée à température ambiante plutôt qu'à basse température permet, d'une part, d'augmenter de

manière significative le rendement du doublet relatif aux protéines de masses moléculaires apparentes comprises entre 100 et 150 kDa et, d'autre part, de diminuer le pourcentage des Immuno-globulines relarguées lors de l'éluat (Figure 29B pistes 3 et 4 comparées à la piste 2). Il est effectivement important de limiter le relargage des immuno-globulines dans l'éluat afin d'identifier d'autant plus facilement les partenaires protéiques potentiels, notamment ceux migrant aux alentours de 50 kDa.

A l'issue de cette étude préliminaire, les conditions d'immuno-précipitation qui nous semblent suffisamment stringentes pour isoler TopR1 et ses partenaires protéiques combinent une force ionique élevée et une incubation de 2 heures à température ambiante pour former les complexes protéiques ((Ag-Ac)-B). Le résultat montré à la piste 3 de la figure 29B est reproductible puisque nous obtenons une seconde fois le même profil protéique (Figure 29B piste 4).

Nous avons donc entrepris une expérience de co-immuno-précipitation en utilisant les anticorps anti-TopR2 dans ces mêmes conditions de forte force ionique (500 mM NaCl) et à température ambiante. Le profil de l'éluat protéique correspondant est montré dans la figure 27B (piste 5). Le profil protéique obtenu avec les anticorps anti-TopR2 est quelque peu différent de celui obtenu avec les anticorps anti-TopR1 ce qui est encourageant. Par contre, le doublet protéique migrant entre 100 et 150 kDa est élué à nouveau. Du fait de la spécificité des anticorps utilisés, nous pouvons dire sans ambiguïté que ce doublet ne peut pas correspondre à chacune des deux reverse gyrases ; il peut s'agir en revanche de partenaires protéiques communs. Là encore il sera important de pouvoir identifier précisément ces différentes bandes protéiques éluées en faisant appel à la spectrométrie de masse.

Etant donné que nous avons montré que les deux reverse gyrases sont des protéines très peu abondantes dans les cellules, y compris lorsque les cellules se divisent activement comme à 80°C (50 molécules de TopR1 par cellule et 125 molécules de TopR2 par cellule), cela peut constituer un facteur limitant dans le rendement des expériences de co-immuno-précipitation.

TopA de S. solfataricus : cible de deux inhibiteurs potentiels

Les ADN topoisomérases IA sont retrouvées chez l'ensemble des organismes à l'exception de deux thaumarchées séquencées à ce jour (Brochier-Armanet *et al.*, 2008b). Cette famille est composée d'au moins trois sous-familles (Tse-Dinh, 1998) :

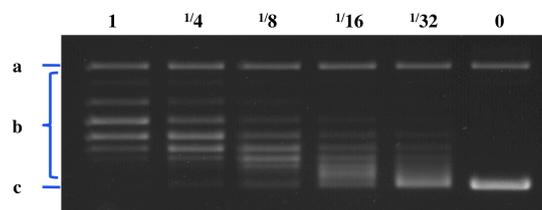


Figure 30- **Effet de différentes dilutions de TopA recombinante sur l'activité de relaxation.**

La réaction standard s'effectue en présence de 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 15 mM MgCl₂, 100 mM NaCl et 0,1 µg d'ADN pTZ surenroulé négativement. Après l'ajout de l'enzyme aux dilutions indiquées au-dessus du gel, le mélange réactionnel est incubé à 75°C pendant 15 minutes. La réaction est stoppée par un passage sur glace puis par l'ajout du tampon de charge (0,1% SDS, 5 mg/ml de bleu de bromophénol et 15% de saccharose). Les produits de la réaction sont analysés par gel d'agarose (1,2%) mono-dimensionnel dans du tampon TEP (36 mM Tris, 30 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7.8) . Les conditions de migration sont de 3 V/cm pendant environ 4 heures. Le gel est lavé avec du tampon TEP pendant 30 minutes, coloré au bromure d'éthidium 2 µg/mL pendant 30 minutes puis révélé sous lumière ultraviolet.

Les dilutions d'enzyme testées sont 1 pour non diluée, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32. La piste 0 correspond au témoin sans enzyme.

ADN circulaire avec une coupure = forme II (a), différents topoisomères correspondant à de l'ADN plus ou moins relâché (b) et de l'ADN surenroulé négativement (c).

les ADN topoisomérases I (ou protéine ω), les ADN topoisomérase III et enfin, la reverse gyrase.

L'ADN topoisomérase TopA recombinante de *S. solfataricus* est, comme toutes les ADN topoisomérases IA classiques, capable de relâcher de l'ADN surenroulé négativement. Son activité de relaxation est dépendante du magnésium et est maximale à 75°C (Dai *et al.*, 2003). D'après cette étude, il a aussi été montré que TopA possède une activité de clivage dépendante d'une séquence nucléotidique, séquence proche de celle reconnue par les ADN topoisomérases III (Dai *et al.*, 2003 ; Chen et Huang, 2006). Ce résultat, ainsi que ceux obtenus au laboratoire, suggère que TopA de *S. solfataricus* peut être assimilée à une ADN topoisomérase III plutôt qu'à une ADN topoisomérase I (protéine ω) (Dai *et al.*, 2003). La délétion du gène *topA*, effectuée chez *S. islandicus*, n'affecte pas la viabilité cellulaire mais entraîne un défaut de croissance qui semblerait lié à un défaut dans la ségrégation des chromosomes (Li *et al.*, 2011).

En collaboration avec l'équipe de Jean-François RIOU, nous avons testé deux inhibiteurs potentiels des ADN topoisomérases IA : MIK 643 et BEZ 9456, sur l'activité de relaxation de la topoisomérase recombinante TopA de *S. solfataricus*. Comme nous l'avons présenté dans la partie I des résultats de cette thèse, nous n'avons pas pu détecter TopA dans les cellules par immuno-détection en fonction des phases de croissance. La caractérisation du mode d'action de ces inhibiteurs *in vitro* nous permettra, à terme, d'utiliser l'un ou l'autre de ces inhibiteurs suivant les résultats obtenus dans différentes conditions expérimentales afin d'observer un phénotype particulier de *S. solfataricus* et ainsi avoir accès à la fonction de TopA *in vivo*.

La première étape fut de trouver la dilution d'enzyme avec laquelle un effet de la molécule testée peut être visualisé. Pour cela, différentes dilutions de TopA recombinante ont été testées dans le test de relaxation d'ADN surenroulé négativement (Figure 30). Les conditions standard de la réaction de relaxation sont indiquées dans la légende de la Figure 30. Pour un temps d'incubation fixé, au plus TopA recombinante est concentrée, au plus l'ADN surenroulé négativement est relâché (Figure 30). Afin de visualiser un effet de l'inhibiteur potentiel, il faut que celle-ci soit à environ 75% d'efficacité. Cette condition est atteinte lorsque l'enzyme est diluée au quart (Figure 30). Pour la suite de l'étude nous allons donc utiliser cette dilution d'enzyme dans chaque expérience.

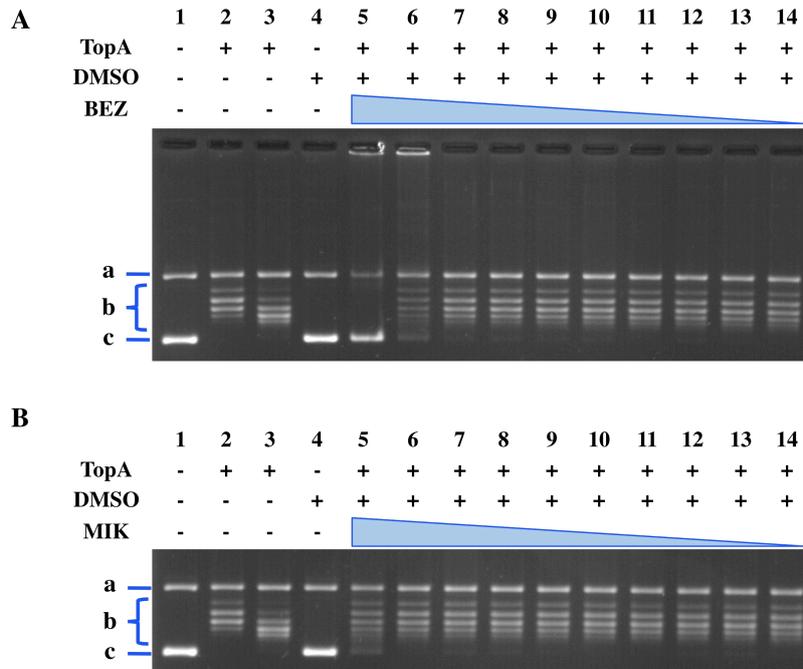


Figure 31- Effet des deux inhibiteurs potentiels BEZ 9456 (A) et MIK 643 (B) sur l'activité de relaxation de TopA recombinante de *S. solfataricus*.

La réaction standard est préparée de la même façon que présentée à la figure 28 pour les pistes 1 à 3. Le milieu réactionnel contient au plus 5% de DMSO (pistes 4-14). Les pistes 1 (sans DMSO) et 4 (avec DMSO) correspondent aux témoins sans enzyme. La réaction enzymatique est réalisée en présence d'un aliquot de TopA non diluée (Piste 2), TopA diluée $\frac{1}{4}$ (pistes 3 et 5-14). La gamme de concentration d'inhibiteur utilisée est identique pour les deux molécules testées : 0,5 mM (piste 5), 0,05 mM (piste 6), 0,005 mM (piste 7), $5 \cdot 10^{-4}$ mM (piste 8), $5 \cdot 10^{-5}$ mM (piste 9), 5 μ M (piste 10), 0,5 μ M (piste 11), 0,05 μ M (piste 12), 5 nM (piste 13) et 0,5 nM (piste 14). Seuls les puits de dépôts 5 et 6 du panel A présentent de la fluorescence résiduelle.

ADN circulaire avec une coupure = forme II (a), différents topoisomères correspondant à de l'ADN plus ou moins relâché (b) et de l'ADN surenroulé négativement (c).

Les molécules testées, BEZ et MIK, sont dissoutes dans du DMSO (Diméthylsulfoxyde) et il est possible que ce solvant ait un effet sur l'activité de TopA. Nous avons donc vérifié au préalable l'effet du DMSO sur l'activité de relaxation de TopA diluée au $\frac{1}{4}$ en testant une gamme de DMSO allant de 10% à 1% (non montré). Nous n'observons une inhibition de l'activité de TopA que pour une concentration de 10% DMSO (non montré). Ainsi, nous allons travailler avec une concentration de DMSO maximale de 5%. A cette concentration, l'effet observé sera lié uniquement à la présence de l'inhibiteur.

Dans un premier temps, nous avons testé pour les deux inhibiteurs une gamme large allant de 0,5 mM à 0,5 nM. D'après les résultats présentés à la Figure 31, nous pouvons voir un effet pour les concentrations les plus élevées en inhibiteurs soit : 0,5 mM et 0,05 mM pour BEZ et 0,5 mM pour MIK (Figures 31A pistes 5-6 et 31B piste 5 respectivement). En effet, les profils électrophorétiques pour les autres concentrations sont similaires suggérant que les inhibiteurs à ces concentrations n'ont pas en effet différent (Figures 31A pistes 7-14 et 31B pistes 6-14). Néanmoins, il semble que le profil obtenu à ces concentrations soit intermédiaire entre un profil obtenu en présence de TopA non diluée (Figure 31 piste 2) et celui obtenu en présence de TopA diluée $\frac{1}{4}$ (Figure 31 piste 3). La différence est peut-être liée à la présence de DMSO apporté par l'aliquot des inhibiteurs en solution. Bien qu'il manque le témoin TopA $\frac{1}{4}$ en présence de DMSO 5%, il semble que ce solvant stimule légèrement l'activité de TopA. Les molécules BEZ et MIK ont un effet globalement similaire pour une concentration de 0,05 mM et 0,5 mM respectivement (Figures 31A piste 6 et 31B piste 5). Cependant pour la molécule BEZ, nous observons de la fluorescence au niveau des puits pour les deux concentrations les plus élevées (Figure 31A pistes 5-6). Cette fluorescence pourrait s'expliquer par le fait que BEZ s'intercale dans l'ADN surenroulé négativement ou se lie covalamment à TopA, empêchant alors le complexe de pénétrer dans le gel. La combinaison de ces deux hypothèses peut aussi être envisagée.

Nous nous sommes ensuite concentrés sur la molécule BEZ et nous nous sommes placés aux concentrations pour lesquelles un effet sur l'activité de relaxation de TopA a été observé (Figure 31A pistes 5-6). Une gamme de concentrations d'inhibiteurs restreinte a été testée pour définir plus précisément à partir de quelle concentration cette molécule n'a plus d'effet sur l'activité de relaxation de TopA.

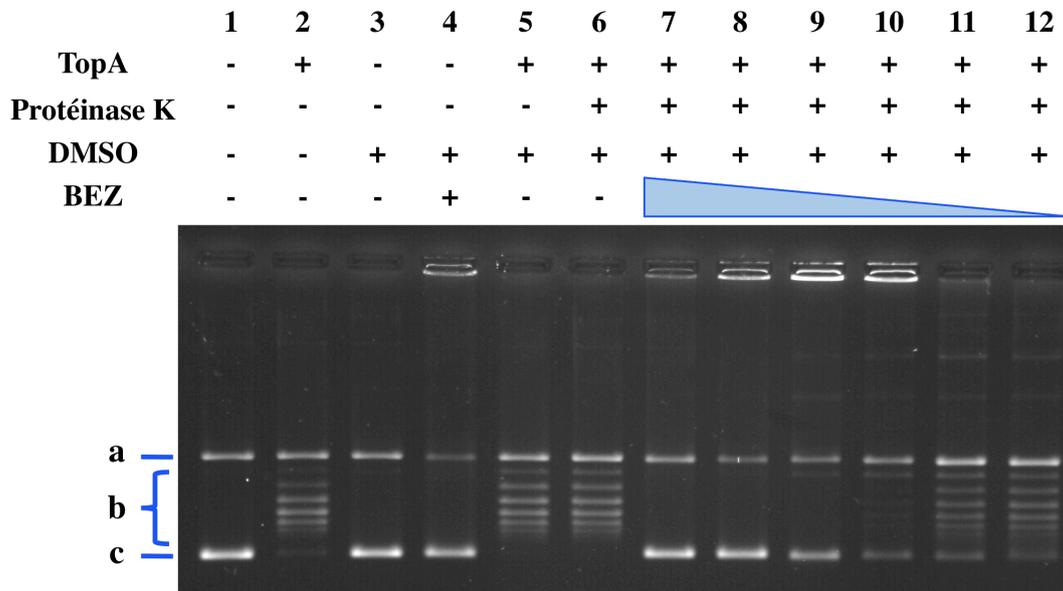


Figure 32- Effet de l'inhibiteur BEZ 9456 sur l'activité de relaxation de TopA recombinante de *S. solfataricus* et traitement des produits de réaction à la protéinase K.

La réaction standard est réalisée de la même façon que présentée à la figure 28 pour les pistes 1 et 2. Le milieu réactionnel contient au plus 5% de DMSO (pistes 3-12). Les pistes 1 (sans DMSO), 3 (+DMSO) et 4 (+DMSO + 0,5 mM BEZ) correspondent aux témoins sans enzyme. La réaction enzymatique est réalisée en présence d'un aliquot de TopA diluée $\frac{1}{4}$ (pistes 2 et 5-12). La gamme de concentration de l'inhibiteur BEZ utilisée est la suivante : 0,5 mM (piste 7), 0,32 mM (piste 8), 0,16 mM (piste 9), 0,08 mM (piste 10), 0,04 mM (piste 11) et 0,02 mM (piste 12). Les produits réactionnels obtenus sont traités à la protéinase K ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) pendant 20 minutes à 65°C (pistes 6 à 12). Les puits de dépôts 4 et 7-10 présentent une fluorescence résiduelle significative. ADN circulaire avec une coupure = forme II (a), différents topoisomères correspondant à de l'ADN plus ou moins relâché (b), ADN surenroulé négativement (c).

Les conditions expérimentales sont indiquées dans la légende de la figure 32. Nous avons déposé le témoin TopA $\frac{1}{4}$ en présence de DMSO 5% (Figure 32 piste 5) et, par comparaison avec le témoin TopA $\frac{1}{4}$ sans DMSO (Figure 32 piste 2), nous pouvons voir, qualitativement, que la proportion l'ADN surenroulé négativement est diminuée en présence de DMSO ce qui suggère que ce solvant apporté par l'ajout de BEZ stimule l'activité de TopA. La forte inhibition de l'activité de relaxation de TopA obtenue pour une concentration de BEZ de 0,5 mM est conservée jusqu'à une concentration de 0,08 mM (Figure 32 piste 10).

Afin de savoir si TopA est covalamment liée à l'ADN en présence de la molécule BEZ nous avons traitée les échantillons à la protéinase K à la suite de la réaction de relaxation (Figure 32). Lorsque l'ADN surenroulé négativement est mis en présence de BEZ à la concentration la plus élevée (0,5 mM), de la fluorescence est observée dans le puits suggérant que la molécule s'intercale passivement dans le substrat (Figure 32 piste 4). Par ailleurs, le traitement à la protéinase K ne semble pas avoir d'effet pour des concentrations comprises entre 0,5 et 0,08 mM BEZ car nous observons encore de la fluorescence dans les puits (Figure 32 pistes 7 à 10). Par contre, pour des concentrations plus faibles, cette fluorescence n'est plus visible (Figure 32 pistes 11 à 12). Il serait intéressant de pouvoir savoir ce qui se passe entre l'ADN et la molécule BEZ à hautes concentrations, car en s'intercalant avec l'ADN la molécule BEZ pourrait modifier la topologie du substrat et participer indirectement à l'inhibition de l'activité de relaxation de TopA.

De plus, il pourrait être envisagé de poursuivre la caractérisation du mode d'action de BEZ et, dans une moindre mesure celle de MIK, puisque toutes deux ont un effet sur l'activité de relaxation de TopA. Les prochains tests envisagés pourraient être ceux de la thermostabilité et de la sensibilité de ces composés vis-à-vis des pH acides, points particulièrement importants pour pouvoir valider leurs utilisations dans des études *in vivo*.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I- Fonctions des ADN topoisomérases de *S. solfataricus*

II- Rôle de la reverse gyrase chez les hyperthermophiles

Au cours de cette thèse nous avons travaillé sous l'hypothèse que les deux reverse gyrases TopR1 et TopR2 du *crenarchaeon* hyperthermophile *S. solfataricus* sont impliquées au moins en partie dans des processus cellulaires différents, ces processus étant liés au métabolisme de l'ADN. Nous avons principalement cherché à vérifier cette hypothèse par l'utilisation d'anticorps dirigés spécifiquement contre ces deux protéines et ainsi observer leurs variations quantitatives *in vivo* en réponses à différents *stimuli*. Pour certaines conditions expérimentales, l'étude a été étendue à la troisième ADN topoisomérase IA, TopA, ainsi qu'aux deux sous-unités de l'ADN topoisomérase VI (A et B) dans le but d'obtenir une vision globale des régulations des ADN topoisomérases de *S. solfataricus*.

Nos résultats sont principalement centrés sur les deux reverse gyrases TopR1 et TopR2. Nous avons montré que TopR1 et TopR2 de *S. solfataricus* sont régulées de manières différentes et sont impliquées dans des processus cellulaires distincts. En effet, TopR1 est impliquée dans la régulation homéostatique du surenroulement de l'ADN de *S. solfataricus*, mise en évidence suite à des variations réciproques de températures. Ce résultat permet d'expliquer, entre autres, pourquoi TopR1 est abondante lorsque les cellules se divisent plus ou moins activement comme nous l'avons vu directement ou indirectement dans les parties I et III respectives de cette thèse.

Par ailleurs, nous avons émis l'hypothèse que TopR2 serait impliquée dans la stabilité des génomes. En effet, contrairement à TopR1, la présence de TopR2 dans des cellules qui ne se divisent plus ou sont incapables d'initier un nouveau cycle de réplication suggère qu'elle soit présente pour veiller au maintien de l'intégrité du génome. De plus, cette implication passerait par son activité de surenroulement positif comme semble le rapporter l'étude de la partie III des résultats.

I- Fonctions des ADN topoisomérases de *S. solfataricus*

Fonctions potentielles de TopA

Dans la première partie de cette thèse, nous avons pu mettre en évidence que l'ADN topoisomérase TopA est indétectable dans nos conditions expérimentales et ce quelle que soit la phase de croissance considérée. Il ne s'agit pas d'un problème de détection des anticorps,

ceux-ci reconnaissant spécifiquement la protéine recombinante. D'autre part, étant donné que son gène est très faiblement transcrit quelle que soit la phase de croissance, y compris la phase exponentielle (F. Garnier communication personnelle), cela suggère que TopA soit présente en très faible quantité et/ou présente dans une sous-population de cellules. Même si cela semble peu probable, nous ne pouvons toutefois pas exclure une perte de la sensibilité de la détection de TopA dans des extraits bruts issus de *S. solfataricus* suite à des modifications post-traductionnelles.

Si nous considérons que TopA intervient dans la résolution des contraintes de surenroulement générées lorsque les cellules se divisent plus ou moins activement, elle doit être très active pour compenser cette très faible quantité. Cependant, sa caractérisation *in vitro* indique que son activité de relaxation est faible comparée à celle de TopR1 (résultat non publié du laboratoire) ce qui rend peu probable le fait que TopA soit impliquée dans la régulation homéostatique du surenroulement.

Par ailleurs, la caractérisation phénotypique d'un mutant de délétion du gène *topA*, obtenu chez le *crenarchaeon S. islandicus*, a montré l'existence d'un défaut de croissance associé, entre autres, à des défauts de ségrégation des chromosomes (Li *et al.*, 2011). Nous avons observé au laboratoire que l'activité de décaténation de l'ADN catalysée par TopA est très efficace (résultat non publié du laboratoire) et pourrait intervenir dans la décaténation des caténanes produits lors de la réplication comme cela a été suggéré (Li *et al.*, 2011). Cette efficacité pourrait expliquer pourquoi, chez le *crenarchaeon S. acidocaldarius*, l'expression du gène *topA* n'est pas induite à un moment précis du cycle cellulaire (Lundgren et Bernander, 2007). En effet, un *scenario* possible est que son efficacité à décaténer compenserait en quelque sorte le besoin pour la cellule d'induire son expression lors de la réplication.

Bien qu'il semble que TopA de *S. solfataricus* soit impliquée dans des processus cellulaires qu'il reste à définir, un ensemble de données indique qu'elle pourrait être impliquée dans des processus de réparation ou de recombinaison.

Tout d'abord, la caractérisation enzymatique de TopA de *S. solfataricus*, a conduit à la classer parmi les ADN topoisomérases III (Dai *et al.*, 2003) et non parmi les TopA comme annoté sur le génome (She *et al.*, 2001). D'autre part, les ADN topoisomérases III sont caractérisées jusqu'à présent par leur capacité à s'associer avec les hélicases de la super famille de type 2 et participent ainsi à la stabilité des génomes (pour une revue Chen *et al.*, 2012). Il a d'ailleurs été montré *in vitro* que TopA de *S. solfataricus* pouvait interagir avec

une hélicase de la super famille de type 2, la protéine Hel 112, et en modulait alors l'activité de l'hélicase lorsque celle-ci a comme substrat des jonctions de Holliday (Valenti *et al.*, 2012). Une autre possibilité pour déterminer le rôle de TopA est l'utilisation d'inhibiteur. Bien qu'aucun inhibiteur spécifique des ADN topoisomérases IA ne soit disponible à ce jour, l'équipe du Pr. Jean-François Riou (MNHN, Paris) travaille sur deux molécules susceptibles d'inhiber les ADN topoisomérases IA : BEZ et MIK. En collaboration avec cette équipe, nous avons pu initier l'étude *in vitro* de l'inhibition par ces deux drogues de l'activité de relaxation d'ADN surenroulé négativement catalysée par TopA. L'étude préliminaire présentée dans la partie IV des résultats de cette thèse montre que les deux drogues inhibent effectivement l'activité de TopA à des concentrations différentes et semblent avoir des effets différents. Certes cette étude doit être poursuivie, mais il semble que l'inhibiteur BEZ en s'intercalant dans l'ADN modifie probablement la topologie de l'ADN ce qui limiterait alors mécaniquement l'action de TopA. Avant d'envisager une utilisation *in vivo*, ces inhibiteurs seront testés sur les deux reverse gyrases TopR1 et TopR2 puisque celles-ci possèdent également un domaine ADN topoisomérase IA. Enfin, nous savons, à travers l'analyse phénotypique de la souche *S. islandicus* délétée pour le gène *topA*, que celui-ci n'est pas un gène essentiel dans les conditions expérimentales testées. Toutefois, il est possible que des mutations compensatrices existent chez ce mutant (Li *et al.*, 2011). Ainsi, afin de vérifier l'implication de TopA de *S. solfataricus* dans la stabilité des génomes, il sera intéressant de tester sur ce mutant l'effet d'une exposition à des rayonnement γ ou au MMS, conditions défavorable à la stabilité des génomes.

Fonctions potentielles de l'ADN topoisomérase VI

La question de l'implication de l'ADN topoisomérase VI dans la régulation homéostatique a été posée dans l'étude présentée dans la partie II des résultats en suivant les variations quantitatives des deux sous-unités A et B de la topoisomérase VI. Nos résultats montrent que le nombre de chacune des sous-unités par cellule est stable qu'il y ait ou non une variation de la température de croissance. De plus, nous montrons que l'activité de la topoisomérase VI recombinante est peu modulée dans la gamme de température élevée. Ces résultats suggèrent que la topoisomérase VI est impliquée dans la régulation homéostatique du surenroulement de par son activité antagoniste à celle de TopR1, mais qu'elle ne fait pas l'objet d'une régulation dynamique comme dans le cas de TopR1.

D'autre part, notre étude permet, pour la première fois, d'avoir accès aux nombres de sous-unités A et B de la topoisomérase VI par cellule chez *S. solfataricus*. De manière intéressante et surprenante, nous montrons que la sous-unité A est 10 fois plus abondante dans les cellules que la sous-unité B. Or, pour relâcher de l'ADN surenroulé négativement il a été montré que la topoisomérase VI est constituée d'une quantité stœchiométrique des deux sous-unités (Buhler *et al.*, 1998). Ainsi, pour accéder au nombre de topoisomérase VI par cellule, il nous faut considérer uniquement la sous-unité présente en plus faible quantité c'est-à-dire la sous-unité B. Partant de ce postulat, le nombre de topoisomérase VI par cellule, dans nos conditions expérimentales, est d'environ 635 molécules par cellule. Ce nombre est du même ordre de grandeur que celui de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV (entre 500 – 10000 molécules par cellule) (Lopez *et al.*, 2005).

Chez *S. solfataricus*, et de manière plus générale chez les Sulfolobales, l'ADN topoisomérase VI est la seule ADN topoisomérase capable de relâcher aussi bien les supertours positifs que négatifs. Etant une topoisomérase de type II, elle peut aussi éliminer les caténanes formés lors de la réplication ou les différentes contraintes topologiques générées au cours de différents processus cellulaires. Cela pourrait expliquer pourquoi l'expression des deux sous-unités de la topoisomérase VI ne semble pas être induite au cours du cycle cellulaire de *S. acidocaldarius* (Lundgren et Bernander, 2007) alors que son implication dans la ségrégation des chromosomes était attendue. Les ADN topoisomérases de type II ayant en général un rôle de structure du chromosome, il est possible que la topoisomérase VI joue ce rôle chez *S. solfataricus*. Cette hypothèse est confortée par la grande quantité de topoisomérase VI dans la cellule mais aussi par sa répartition sub-cellulaire. En effet, nous avons montré que la sous-unité B est majoritairement associée au nucléoïde, ce qui implique que la topoisomérase VI le soit également.

Enfin, la sous-unité A de la topoisomérase VI présente une homologie avec la protéine Spo11, protéine impliquée dans la recombinaison méiotique chez la levure (Nichols *et al.*, 1999 ; Bergerat *et al.*, 1997). A la fois sa répartition sub-cellulaire (une partie non négligeable est cytosolique) et sa quantité beaucoup plus importante par rapport à la sous-unité B de la topoisomérase VI, nous permettent d'envisager une fonction propre à la sous-unité A. Pour cela, elle pourrait interagir avec d'autres partenaires protéiques que la sous-unité B, partenaires protéiques que nous pourrions rechercher par co-immunoprécipitation.

Fonction de TopR1 : Implication dans la régulation homéostatique du surenroulement de l'ADN

L'implication de TopR1 dans la régulation homéostatique du surenroulement de l'ADN chez *S. solfataricus* a été démontrée *in vivo* lors de variations de températures réciproques (résultats présentés dans la partie II des résultats). En effet, alors que les niveaux de TopR2 et des sous-unités A et B de la topoisomérase VI restent constants, le niveau de TopR1 varie en réponse aux variations de température. Suite à une augmentation de la température, nous constatons que le nombre de TopR1 par cellule diminue et à l'inverse, lors d'une diminution de la température, le nombre de TopR1 par cellule est augmenté. Il avait été montré que suite à une variation de la température, la densité de surenroulement de plasmide est fortement augmentée au cours de la première heure puis, elle revient progressivement à un niveau de surenroulement adapté à la vie à la nouvelle température au cours des 7 heures suivantes (López-García et Forterre, 1999). En suivant la croissance des cellules transférées à la température cible sur une période de 28 heures, nous montrons que les cellules sont adaptées à la nouvelle température puisqu'elles arborent la densité optique maximale ainsi que le temps de génération caractéristiques de la température cible. De plus, il est intéressant de noter que le nombre de molécules de TopR1 par cellule obtenu après 6 heures correspond globalement à celui des cellules en phase exponentielle de la température cible. Ce résultat renforce l'implication de TopR1 dans le maintien d'un surenroulement global adapté à la température de vie.

Nos résultats mettent en évidence que, chez *S. solfataricus*, le contrôle du surenroulement s'effectue par la modulation de l'activité et de la quantité de TopR1 en réponse à un changement de la température. Cela rappelle la régulation homéostatique du surenroulement existant chez la bactérie mésophile *E. coli* qui fait intervenir des activités enzymatiques antagonistes ainsi qu'un contrôle de l'expression de chacun des gènes spécifiant ces enzymes par le surenroulement (Menzel et Gellert, 1983 ; Tse-Dinh, 1985). Chez *S. solfataricus*, le contrôle homéostatique du surenroulement est médié par TopR1 lors de changement brusque de température. Cette régulation effectuée par TopR1 n'est pas exclusivement déclenchée lors d'une variation de température mais est liée, d'une façon générale, à l'état physiologique des cellules comme le montrent les chapitres I et III des résultats de cette thèse. En effet, nous avons observé, en fin de phase de ralentissement et en phase de déclin, la disparition de TopR1. De même, à basse température, lorsque la

réplication et la transcription sont très fortement ralenties, TopR1 disparaît suggérant qu'elle ne soit pas nécessaire. En accord avec le caractère distributif de TopR1, son rôle dans la réplication et la transcription pourrait être de réassocier rapidement les deux brins de la double hélice en amont des machineries. Ainsi, TopR1 semble agir à deux niveaux ; à un niveau global, visualisé par exemple lors des changements de température, mais également à un niveau local, en association avec la machinerie de réplication ou de transcription de l'ADN.

Enfin, les résultats présentés dans cette thèse ainsi que ceux précédemment publiés par le laboratoire (Garnier et Nadal, 2008), indiquent que la régulation de TopR1 se fait essentiellement au niveau transcriptionnel. Il serait intéressant de voir si la région promotrice de *topR1* et la machinerie de transcription basale présentent effectivement une sensibilité au surenroulement permettant de rendre compte directement de la régulation homéostatique.

Finalement, le modèle que nous proposons permet également d'expliquer l'augmentation du surenroulement de plasmides isolés de différentes Sulfolobales observée lors de leur croissance (López-García et Forterre, 1997). Malgré tout, l'absence de données précises concernant la TopoVI ne nous permet pas d'avoir actuellement une conclusion définitive.

Fonction de TopR2 : Implication dans la stabilité des génomes

Bien que des variations de transcrits du gène *topR2* aient été observées (Lundgren et Bernander, 2007 ; Garnier et Nadal, 2008), nous n'avons pas observé de grandes variations de TopR2 à l'échelle protéique. En revanche, nous avons vu que cette protéine possède vraisemblablement des modifications post-traductionnelles suggérant que sa régulation se fait en grande partie au niveau traductionnel. Le fait que cette seconde reverse gyrase soit retrouvée en abondance dans des conditions physiologiques particulières à haute comme à basse température suggère que TopR2 joue un rôle dans des processus tels que la réparation et la recombinaison. *In vitro*, nous avons montré que, contrairement à TopR1 qui n'est plus active à 45°C, TopR2 est capable d'introduire un nombre non négligeable de supertours positifs dans l'ADN à cette température. Cependant, l'extraordinaire processivité de TopR2 démontrée à hautes températures (Bizard *et al.*, 2011) est réduite à 45°C. *In vivo*, sur les deux reverse gyrases, seule TopR2 est maintenue en abondance à basse température. Ces résultats laissent sous-entendre que si TopR2 intervient, son action passe par cette activité

d'introduction de supertours positifs. Or, lors des premières 48 heures à 45°C, la division cellulaire est certes ralentie mais se poursuit tout comme la réplication. Comme TopR1 n'est plus capable d'assurer la régulation homéostatique du surenroulement, il est possible que TopR2, devenue légèrement plus distributive à basse température, puisse se substituer en partie à TopR1 pour cette fonction et permettre à la réplication initiée à 80°C de s'achever. Il est même envisageable que TopR2 soit alors nécessaire dans cette condition afin de surenrouler positivement l'ADN. En effet, sans son intervention, la densité de surenroulement de l'ADN diminuerait fortement en réponse à la baisse de la température ce qui aurait pour conséquence de bloquer l'initiation de la transcription, au moins des gènes sensibles au surenroulement, et bien sûr en premier lieu le gène *topR1*. TopR2 étant vraisemblablement régulée au niveau post-traductionnel, son expression ne serait donc pas affectée. Au-delà de 48 heures après transfert, il n'y a plus de réplication observée mais TopR2 est toujours maintenue. Ces résultats suggèrent que cette reverse gyrase intervienne dans d'autre(s) fonction(s) telles que dans la recombinaison qui peut avoir lieu entre les deux chromosomes obtenus et maintenus suite au transfert à 45°C. D'ailleurs, il a été récemment mis en évidence que la reverse gyrase déstabilise des jonctions à 4 branches synthétiques mimant des jonctions de Holliday (Valenti *et al.*, 2010).

Enfin, l'intervention de TopR2 pourrait expliquer l'augmentation de densité de surenroulement de plasmides au cours de la croissance d'archées hyperthermophiles (López-García et Forterre, 1997) mais, de nouveau, l'absence de données concernant la topoisomérase VI limite nos conclusions.

II- Compréhension du rôle de la reverse gyrase chez les hyperthermophiles

Tous les organismes hyperthermophiles, bactéries comme archées, possèdent au moins un gène codant la reverse gyrase (Brochier-Armanet et Forterre, 2006). En effet, les *Euryarchaeota* hyperthermophiles, les bactéries hyperthermophiles ainsi que les Thermoprotéales ne possèdent qu'un seul gène codant la reverse gyrase nommé *topR*, alors que les *Crenarchaeota* hyperthermophiles (à l'exception des Thermoprotéales) possèdent deux gènes codant les reverse gyrases *topR1* et *topR2*. L'ensemble de ces reverse gyrases sont capables d'introduire des supertours positifs dans l'ADN et présentent un fort pourcentage d'identité entre elles. En effet, la comparaison des séquences en acides aminés des reverse

gyrases de Sulfolobales, Thermococcales et Thermotogales indique que leur domaine topoisomérase IA partage 38 à 46% d'identité et leur domaine hélicase 32 à 40% d'identité (Bouthier de la Tour *et al.*, 1998). Les reverse gyrases de tous ces organismes doivent donc être considérées comme très proches. C'est d'ailleurs ce qui est admis pour TopR1 et TopR2 de *S. solfataricus* dont les domaines topoisomérase partagent 40% d'identité et les domaines hélicases partagent 30% d'identité (Bizard *et al.*, 2011). Cependant, la caractérisation enzymatique fine des deux reverse gyrases de *S. solfataricus* indique clairement une grande diversité de fonctionnement (Bizard *et al.*, 2011). Si à l'heure actuelle, seule la reverse gyrase recombinante de *Thermotoga maritima* partage partiellement des caractéristiques enzymatiques de TopR1, notamment par l'activité de relaxation ATP indépendante (Bouthier de la Tour *et al.*, 2008), l'unique reverse gyrase d'*Archaeoglobus fulgidus* possède des propriétés intermédiaires entre les deux reverse gyrases de *S. solfataricus* (Rodríguez, 2003 ; Hsieh et Capp, 2005).

D'un point de vue fonctionnel, nous pouvons rapprocher la reverse gyrase TopR1 de la reverse gyrase TopR. En effet, nous avons montré que le nombre de TopR1 par cellule est augmenté suite à un passage de 45°C à 80°C. Un résultat similaire est observé mais à l'échelle transcriptionnelle chez certaines bactéries thermophiles modérées. En effet, chez *N. profundicola*, l'expression du gène codant la reverse gyrase *topR* est fortement induite après un passage à plus haute température (Campbell *et al.*, 2009). Ce résultat montre par ailleurs que la reverse gyrase représente un avantage pour la vie à haute température chez ces micro-organismes.

D'autre part, nos résultats *in vivo* montrent clairement que TopR1 et TopR2 sont deux reverse gyrases bien distinctes, impliquées dans des processus cellulaires différents. De plus, il a récemment été montré que la délétion de chacun des gènes *topR1* et *topR2* est létale chez *S. islandicus* indiquant ainsi que ces deux gènes sont essentiels (Zhang *et al.*, 2013). A la lumière de nos résultats, nous comprenons clairement que la délétion de *topR1* à hautes températures, entraîne une perte du maintien de l'homéostasie de surenroulement ce qui est forcément très délétère pour un organisme hyperthermophile. De la même façon, l'absence de TopR2 au sein d'une cellule soumise à des conditions environnementales drastiques représente un désavantage pour sa croissance. Ces résultats remettent en question les résultats obtenus en 2004 sur une souche de *Thermococcus kodakaraensis* délétée pour l'unique gène *topR* codant la reverse gyrase (Atomi *et al.*, 2004). En effet, contrairement aux résultats obtenus chez *S. islandicus* (mais également chez *S. solfataricus* ; G. Sezonov communication personnelle), chez *T. kodakaraensis*, la délétion de l'unique gène codant une reverse gyrase

n'est pas létale (Atomi *et al.*, 2004). Pourtant, il est clair que la croissance de la souche mutante est affectée par cette délétion dès 60°C, cet effet devenant de plus en plus important avec l'augmentation de températures (Atomi *et al.*, 2004). De plus, il a été montré qu'un plasmide isolé de *T. kodakaraensis* cultivé à 65°C était surenroulé positivement ce qui suggère que, même à basse température, cette euryarchée est capable de surenrouler positivement son ADN. Etant donné qu'aucune recherche de mutations compensatrices n'a été effectuée sur ce mutant et que nous ne savons pas si cette souche mutante s'entretient aux différentes températures testées, il est nécessaire de rester très prudent quant à l'interprétation que nous pouvons avoir de ce mutant. De plus, aucune étude de la reverse gyrase, ou de façon plus générale des topoisomérases de cet organisme, n'a été effectuée. En particulier, il est envisageable qu'une association entre la topoisomérase IA de cet organisme et une hélicase de la super famille de type 2 reconstitue une reverse gyrase fonctionnelle ce qui permettrait d'expliquer la viabilité du mutant.

Nous avons montré que *S. solfataricus* est capable de se diviser de 60°C à 88°C et que TopR1 est importante dans la régulation homéostatique du surenroulement. Cela suggère que l'activité d'introduction de supertours positifs dans l'ADN est importante dans la croissance de *S. solfataricus*. Pourtant, à 60°C la densité de surenroulement de plasmides isolés de Sulfolobales sont dans un état allant du surenroulé négativement à relâché (López-García et Forterre, 1997). Cela peut s'expliquer par le fait qu'à cette température TopR1 relâche principalement l'ADN surenroulé négativement (Bizard *et al.*, 2011). Par contre, à 45°C, TopR1 n'est plus active et les cellules ne sont plus capables de se diviser. Chez *S. solfataricus*, un surenroulement à basse température reste toutefois possible grâce à l'activité de TopR2. Pour les *Crenarchaeota* possédant deux copies du gène codant la reverse gyrase, la gamme de température à laquelle ils se divisent plus ou moins activement pourrait être corrélée à la plage de présence d'activité de TopR1 et donc, serait déterminée en fonction de la capacité des cellules à maintenir une régulation homéostatique du surenroulement. Ce contrôle doit être médié par une enzyme distributive qui introduit des supertours positifs dans l'ADN en fonction de la température, caractéristiques de TopR1.

Nous avons montré que le *crenarchaeon* hyperthermophile *S. solfataricus* est capable de survivre à basse température (45°C) sur une longue période sans se diviser. Ce résultat illustre la survie à long terme d'un organisme hyperthermophile placé à basse température, concept évoqué mais très peu démontré (Stetter *et al.*, 1990). De la même manière que ce qui a été montré à court terme chez *S. acidocaldarius* (Hjort et Bernander, 1999), il

semblerait que les cellules maintiennent cet état physiologique dans l'attente de conditions physiologiques meilleures. Ce que nous voyons à long terme est que ces cellules maintenues à 45°C contiennent deux génomes et qu'elles sont prêtes à rentrer à nouveau dans un cycle cellulaire, lorsqu'elles rencontreront des conditions permissives. Cette extraordinaire propriété de résistance « au froid » pourrait faciliter la dissémination de *S. solfataricus* à travers différents environnements et peut aussi expliquer comment des niches écologiques distantes caractérisées par des propriétés géothermiques similaires sont colonisées par des souches proches appartenant au genre *Sulfolobus* (Brock *et al.*, 1972). D'après nos résultats, TopR2 pourrait être responsable de cette adaptation puisqu'elle est la seule capable de moduler la topologie à cette température et peut intervenir également dans la réparation et la recombinaison entre les deux chromosomes présents dans ces cellules. Il est donc possible que cette enzyme particulière soit une reverse gyrase importante pour la stabilité des génomes mais aussi pour l'adaptation. Pour poursuivre cette idée, nous avons émis l'hypothèse que TopR2 pouvait se substituer à TopR1 lors de la réplication se produisant durant les 48 premières heures où *S. solfataricus* est placé à 45°C. Que se passe-t-il pour la machinerie de réplication ? Chez *S. solfataricus*, il a été montré que l'ADN polymérase répliquative et l'ADN polymérase translésionnelle sont encore actives à basse température (Lin *et al.*, 2012). Or, un des partenaires protéiques connus de l'ADN polymérase translésionnelle (SsoPolY/Dpo4) est la reverse gyrase (Valenti *et al.*, 2009). De plus, l'ADN polymérase translésionnelle est elle-même recrutée par le facteur de processivité PCNA (Beattie & Bell, 2011 ; Winter et Bunting, 2012). L'interaction entre PolY et la reverse gyrase a été mise en évidence *in vitro* en utilisant exclusivement TopR1. Il serait intéressant de savoir si la même interaction existe avec TopR2, voire TopA, étant donné que l'interaction se fait au niveau du domaine topoisomérase IA. Malgré tout, lors de l'interaction TopR1-PolY la reverse gyrase inhibe l'ADN polymérase translésionnelle. Lors d'une réplication à 45°C, une levée de l'inhibition de PolY doit donc avoir lieu, ce qui devrait avoir pour conséquence une augmentation du taux de mutation. Certes, cet effet doit être assez négatif sur la plupart des cellules mais *a contrario*, cela peut favoriser l'émergence de cellule mieux adaptées aux nouvelles conditions de vie. Ainsi, le passage à basse température n'altère pas les capacités de croissance de *S. solfataricus* mais pourrait même favoriser son adaptation en augmentant la fréquence de mutations !

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, D. E., Shekhtman, E. M., Zechiedrich, E. L., Schmid, M. B. & Cozzarelli, N. R. (1992). The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell* 71(2), 277–288.
- Agback, P., Baumann, H., Knapp, S., Ladenstein, R. & Härd, T. (1998). Architecture of nonspecific protein-DNA interactions in the Sso7d-DNA complex. *Nature structural biology* 5(7), 579–584.
- Ambjörnsson, T., Banik, S. K., Krichevsky, O. & Metzler, R. (2007). Breathing Dynamics in Heteropolymer DNA. *Biophysical Journal* 92(8), 2674–2684.
- Aravind, L., Walker, D. R. & Koonin, E. V. (1999). Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Research* 27(5), 1223–1242.
- Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B. C., Love, W. E. & Moudrianakis, E. N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(22), 10148–10152.
- Atomi, H., Matsumi, R. & Imanaka, T. (2004). Reverse gyrase is not a prerequisite for hyperthermophilic life. *Journal of Bacteriology* 186(14), 4829–4833.
- Baliga, N. S., Bjork, S. J., Bonneau, R., Pan, M., Iloanusi, C., Kottmann, M. C. H., Hood, L. & DiRuggiero, J. (2004). Systems level insights into the stress response to UV radiation in the halophilic archaeon Halobacterium NRC-1. *Genome research* 14(6), 1025–1035.
- Balke, V. L. & Gralla, J. D. (1987). Changes in the linking number of supercoiled DNA accompany growth transitions in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology* 169(10), 4499–4506.
- Barns, S. M., Delwiche, C. F., Palmer, J. D. & Pace, N. R. (1996). Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(17), 9188–9193.
- Barry, E. R. & Bell, S. D. (2006). DNA replication in the archaea. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* 70(4), 876–887.
- Basen, M., Sun, J. & Adams, M. W. W. (2012). Engineering a hyperthermophilic archaeon for temperature-dependent product formation. *mBio* 3(2), e00053–12.
- Bates, A. D. & Maxwell, A. (1993). *DNA topology*. Oxford University Press.
- Bauer, W. R. (1978). Structure and reactions of closed duplex DNA. *Annual review of biophysics and bioengineering* 7, 287–313.
- Baumann, H., Knapp, S., Lundbäck, T., Ladenstein, R. & Härd, T. (1994). Solution structure and DNA-binding properties of a thermostable protein from the archaeon Sulfolobus solfataricus. *Nature structural biology* 1(11), 808–819.
- Beattie, T. R. & Bell, S. D. (2011). Molecular machines in archaeal DNA replication. *Current Opinion in Chemical Biology* 15(5), 614–619.
- Bell, S. D., Jaxel, C., Nadal, M., Kosa, P. F. & Jackson, S. P. (1998). Temperature, template topology, and factor requirements of archaeal transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(26), 15218–15222.
- Belova, G. I., Prasad, R., Kozyavkin, S. A., Lake, J. A., Wilson, S. H. & Slesarev, A. I. (2001). A type IB topoisomerase with DNA repair activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(11), 6015–6020.
- Belova, G. I., Prasad, R., Nazimov, I. V., Wilson, S. H. & Slesarev, A. I. (2002). The Domain Organization and Properties of Individual Domains of DNA Topoisomerase V, a Type IB Topoisomerase with DNA Repair Activities. *Journal of Biological Chemistry* 277(7), 4959–4965.
- Berger, J. M. & Wang, J. C. (1996). Recent developments in DNA topoisomerase II structure and mechanism. *Current opinion in structural biology* 6(1), 84–90.
- Bergerat, A., De Massy, B., Gadelle, D., Varoutas, P.-C., Nicolas, A. & Forterre, P. (1997). An atypical topoisomerase II from archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* 386, 414–417.
- Bergerat, A., Gadelle, D. & Forterre, P. (1994). Purification of a DNA topoisomerase II from the hyperthermophilic archaeon Sulfolobus shibatae. *The Journal of biological chemistry* 269(44), 27663–27669.

- Bermejo, R., Doksan, Y., Capra, T., Katou, Y. M., Tanaka, H., Shirahige, K. & Foiani, M. (2007). Top1- and Top2-mediated topological transitions at replication forks ensure fork progression and stability and prevent DNA damage checkpoint activation. *Genes & development* 21(15), 1921–1936.
- Bernander, R. (2007). The cell cycle of *Sulfolobus*. *Molecular Microbiology* 66(3), 557–562.
- Bernander, R. & Poplawski, A. (1997). Cell cycle characteristics of thermophilic archaea. *Journal of Bacteriology* 179(16), 4963–4969.
- Bigot, S. & Marians, K. J. (2010). DNA chirality-dependent stimulation of topoisomerase IV activity by the C-terminal AAA+ domain of FtsK. *Nucleic Acids Research* 38(9), 3031–3040.
- Bizard, A., Garnier, F. & Nadal, M. (2011). TopR2, the second reverse gyrase of *Sulfolobus solfataricus*, exhibits unusual properties. *Journal of Molecular Biology* 408(5), 839–849.
- Blot, N., Mavathur, R., Geertz, M., Travers, A. & Muskhelishvili, G. (2006). Homeostatic regulation of supercoiling sensitivity coordinates transcription of the bacterial genome. *EMBO reports* 7(7), 710–715.
- Blöchl, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H. W. & Stetter, K. O. (1997). *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 degrees C. *Extremophiles : life under extreme conditions* 1(1), 14–21.
- Bouthier de la Tour, C., Amrani, L., Cossard, R., Neuman, K. C., Serre, M. C. & Duguet, M. (2008). Mutational analysis of the helicase-like domain of *Thermotoga maritima* reverse gyrase. *The Journal of biological chemistry* 283(41), 27395–27402.
- Bouthier de la Tour, C., Portemer, C., Huber, R., Forterre, P. & Duguet, M. (1991). Reverse gyrase in thermophilic eubacteria. *Journal of Bacteriology* 173(12), 3921–3923.
- Bouthier de la Tour, C., Portemer, C., Kaltoum, H. & Duguet, M. (1998). Reverse gyrase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: properties and gene structure. *Journal of Bacteriology* 180(2), 274–281.
- Bouthier de la Tour, C., Portemer, C., Nadal, M., Stetter, K. O., Forterre, P. & Duguet, M. (1990). Reverse gyrase, a hallmark of the hyperthermophilic archaeobacteria. *Journal of Bacteriology* 172(12), 6803–6808.
- Brill, S. J., DiNardo, S., Voelkel-Meiman, K. & Sternglanz, R. (1987). Need for DNA topoisomerase activity as a swivel for DNA replication for transcription of ribosomal RNA. *Nature* 326(6111), 414–416.
- Brochier, C., Forterre, P. & simonetta, G. (2005). An emerging phylogenetic core of Archaea: phylogenies of transcription and translation machineries converge following addition of new genome sequences. *BMC evolutionary biology* 5, 36.
- Brochier-Armanet, C. & Forterre, P. (2006). Widespread distribution of archaeal reverse gyrase in thermophilic bacteria suggests a complex history of vertical inheritance and lateral gene transfers. *Archaea (Vancouver, B.C.)* 2(2), 83–93.
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S. & Forterre, P. (2008a). Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology* 6(3), 245–252.
- Brochier-Armanet, C., Gribaldo, S. & Forterre, P. (2008b). A DNA topoisomerase IB in Thaumarchaeota testifies for the presence of this enzyme in the last common ancestor of Archaea and Eucarya. *Biology Direct* 3(1), 54.
- Brock, T. D. (1997). *The value of basic research: discovery of Thermus aquaticus and other extreme thermophiles*. *Genetics* pp 1207–1210.
- Brock, T. D. & Freeze, H. (1969). *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of Bacteriology* 98(1), 289–297.
- Brock, T. D., Brock, K. M., Belly, R. T. & Weiss, R. L. (1972). *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Archiv für Mikrobiologie* 84(1), 54–68.
- Buhler, C., Gadelle, D., Forterre, P., Wang, J. C. & Bergerat, A. (1998). Reconstitution of DNA topoisomerase VI of the thermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae* from subunits separately overexpressed in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 26(22), 5157–5162.

- Campbell, B. J., Smith, J. L., Hanson, T. E., Klotz, M. G., Stein, L. Y., Lee, C. K., Wu, D., Robinson, J. M., Khouri, H. M., Eisen, J. A. & Cary, S. C. (2009). Adaptations to submarine hydrothermal environments exemplified by the genome of *Nautilia profundicola*. *PLoS genetics* 5(2), e1000362.
- Cavicchioli, R., Amils, R., Wagner, D. & McGenity, T. (2011). Life and applications of extremophiles. *Environmental Microbiology* 13(8), 1903–1907.
- Champoux, J. J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual review of biochemistry* 70, 369–413.
- Charbonnier, F. & Forterre, P. (1994). Comparison of plasmid DNA topology among mesophilic and thermophilic eubacteria and archaeobacteria. *Journal of Bacteriology* 176(5), 1251–1259.
- Charlier, D. & Droogmans, L. (2005). Microbial Life at high temperature, the challenges, the strategies. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62(24), 2974–2984.
- Chen, J. D. & Lacks, S. A. (1991). Role of uracil-DNA glycosylase in mutation avoidance by *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology* 173(1), 283–290.
- Chen, L. & Huang, L. (2006). Oligonucleotide cleavage and rejoining by topoisomerase III from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: temperature dependence and strand annealing-promoted DNA religation. *Molecular Microbiology* 60(3), 783–794.
- Chen, S. H., Chan, N.-L. & Hsieh, T.-S. (2012). New Mechanistic and Functional Insights into DNA Topoisomerases. *Annual review of biochemistry* 82(1), 130315121316003.
- Cheng, B., Zhu, C.-X., Ji, C., Ahumada, A. & Tse-Dinh, Y.-C. (2003). Direct interaction between *Escherichia coli* RNA polymerase and the zinc ribbon domains of DNA topoisomerase I. *The Journal of biological chemistry* 278(33), 30705–30710.
- Chia, N., Cann, I. & Olsen, G. J. (2010). Evolution of DNA replication protein complexes in Eukaryotes and Archaea. *PLoS one* 5(6), e10866.
- Chien, A., Edgar, D. B. & Trela, J. M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology* 127(3), 1550–1557.
- Confalonieri, F., Elie, C., Nadal, M., La Tour, de, C., Forterre, P. & Duguet, M. (1993). Reverse gyrase: a helicase-like domain and a type I topoisomerase in the same polypeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(10), 4753–4757.
- Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P. O. & Hanawalt, P. C. (2001). Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* 158(1), 41–64.
- Crisona, N. J., Strick, T. R., Bensimon, D., Croquette, V. & Cozzarelli, N. R. (2000). Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by *E. coli* topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements. *Genes & development* 14(22), 2881–2892.
- Cubeddu, L. & White, M. F. (2005). DNA Damage Detection by an Archaeal Single-stranded DNA-binding Protein. *Journal of Molecular Biology* 353(3), 507–516.
- Cubonova, L., Katano, M., Kanai, T., Atomi, H., Reeve, J. N. & Santangelo, T. J. (2012). An Archaeal Histone Is Required for Transformation of *Thermococcus kodakarensis*. *Journal of Bacteriology* 194(24), 6864–6874.
- Cubonova, L., Sandman, K., Hallam, S. J., DeLong, E. F. & Reeve, J. N. (2005). Histones in crenarchaea. *Journal of Bacteriology* 187(15), 5482–5485.
- Črnigoj, M., Podlesek, Z., Zorko, M., Jerala, R., Anderluh, G. & Ulrih, N. P. (2013). Interactions of Archaeal Chromatin Proteins Alba1 and Alba2 with Nucleic Acids. (Karbstein, K., Ed.) *PLoS one* 8(2), e58237.
- Dai, P., Wang, Y., Ye, R., Chen, L. & Huang, L. (2003). DNA topoisomerase III from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* with specific DNA cleavage activity. *Journal of Bacteriology* 185(18), 5500–5507.
- Daniel, R. M. & Cowan, D. A. (2000). Biomolecular stability and life at high temperatures. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 57(2), 250–264.
- De Vuyst, G., Aci, S., Genest, D. & Culard, F. (2005). Atypical recognition of particular DNA sequences by the archaeal chromosomal MC1 protein. *Biochemistry* 44(30), 10369–10377.

- Decanniere, K., Babu, A. M., Sandman, K., Reeve, J. N. & Heinemann, U. (2000). Crystal structures of recombinant histones HMfA and HMfB from the hyperthermophilic archaeon *Methanothermus fervidus*. *Journal of Molecular Biology* 303(1), 35–47.
- De la Torre, J. R., Walker, C. B., Ingalls, A. E., Könneke, M. & Stahl, D. A. (2008). Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environmental Microbiology* 10(3), 810–818.
- DeLange, R. J., Williams, L. C. & Searcy, D. G. (1981). A histone-like protein (HTa) from *Thermoplasma acidophilum*. *The Journal of biological chemistry* 256(2), 905–911.
- Depew, D. E. & Wang, J. C. (1975). Conformational fluctuations of DNA helix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(11), 4275–4279.
- Déclais, A. C., Marsault, J., Confalonieri, F., Bouthier de la Tour, C. & Duguet, M. (2000). Reverse gyrase, the two domains intimately cooperate to promote positive supercoiling. *The Journal of biological chemistry* 275(26), 19498–19504.
- Dianov, G. & Lindahl, T. (1991). Preferential recognition of I.T base-pairs in the initiation of excision-repair by hypoxanthine-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Research* 19(14), 3829–3833.
- DiGate, R. J. & Marians, K. J. (1988). Identification of a potent decatenating enzyme from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 263(26), 13366–13373.
- DiNardo, S., Voelkel, K. & Sternglanz, R. (1984). DNA topoisomerase II mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: topoisomerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81(9), 2616–2620.
- DiNardo, S., Voelkel, K. A., Sternglanz, R., Reynolds, A. E. & Wright, A. (1982). *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell* 31(1), 43–51.
- Doolittle, W. F. & Logsdon, J. M. (1998). Archaeal genomics: do archaea have a mixed heritage? *Current biology : CB* 8(6), R209–11.
- Dorman, C. J., Barr, G. C., Ni Bhriain, N. & Higgins, C. F. (1988). DNA supercoiling and the anaerobic and growth phase regulation of tonB gene expression. *Journal of Bacteriology* 170(6), 2816–2826.
- Drake, J. W. (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(16), 7160–7164.
- Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D. & Crow, J. F. (1998). Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 148(4), 1667–1686.
- Drlica, K. (1992). Control of bacterial DNA supercoiling. *Molecular Microbiology* 6(4), 425–433.
- Duggin, I. G., McCallum, S. A. & Bell, S. D. (2008). Chromosome replication dynamics in the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(43), 16737–16742.
- Duguet, M. (1993). The helical repeat of DNA at high temperature. *Nucleic Acids Research* 21(3), 463–468.
- Duguet, M., Lavenot, C., Harper, F., Mirambeau, G. & De Recondo, A.-M. (1983). DNA topoisomeraes from rat liver: physiological variations. *Nucleic Acids Research* 11, 1059–1075.
- Duguet, M., Serre, M. C. & Bouthier de la Tour, C. (2006). A Universal Type IA Topoisomerase Fold. *Journal of Molecular Biology* 359(3), 805–812.
- Duncan, B. K., Rockstroh, P. A. & Warner, H. R. (1978). *Escherichia coli* K-12 mutants deficient in uracil-DNA glycosylase. *Journal of Bacteriology* 134(3), 1039–1045.
- Durand-Dubief, M., Persson, J., Norman, U., Hartsuiker, E. & Ekwall, K. (2010). Topoisomerase I regulates open chromatin and controls gene expression in vivo. *The EMBO journal* 29(13), 2126–2134.
- Espeli, O., Lee, C. & Marians, K. J. (2003). A physical and functional interaction between *Escherichia coli* FtsK and topoisomerase IV. *The Journal of biological chemistry* 278(45), 44639–44644.
- Forterre, P. (2002). A hot story from comparative genomics: reverse gyrase is the only hyperthermophile-specific protein. *Trends in genetics : TIG* 18(5), 236–237.
- Forterre, P. (2006). DNA topoisomerase V: a new fold of mysterious origin. *Trends in Biotechnology* 24(6), 245–247.

- Forterre, P., Bergerat, A. & López-García, P. (1996). The unique DNA topology and DNA topoisomerases of hyperthermophilic archaea. *FEMS microbiology reviews* 18(2-3), 237–248.
- Forterre, P., Elie, C. & Kohiyama, M. (1984). Aphidicolin inhibits growth and DNA synthesis in halophilic archaeobacteria. *Journal of Bacteriology* 159(2), 800–802.
- Forterre, P., Mirambeau, G., Jaxel, C., Nadal, M. & Duguet, M. (1985). High positive supercoiling in vitro catalyzed by an ATP and polyethylene glycol-stimulated topoisomerase from *Sulfolobus acidocaldarius*. *The EMBO journal* 4(8), 2123–2128.
- Fox, G. E., Magrum, L. J., Balch, W. E., Wolfe, R. S. & Woese, C. R. (1977). Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(10), 4537–4541.
- FRANKLIN, R. E. & GOSLING, R. G. (1953). Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* 171(4356), 740–741.
- Frederico, L. A., Kunkel, T. A. & Shaw, B. R. (1990). A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy. *Biochemistry* 29(10), 2532–2537.
- French, S. L., Santangelo, T. J., Beyer, A. L. & Reeve, J. N. (2007). Transcription and translation are coupled in Archaea. *Molecular biology and evolution* 24(4), 893–895.
- Friedman, S. M. & Oshima, T. (1989). Polyamines of sulfur-dependent archaeobacteria and their role in protein synthesis. *Journal of biochemistry* 105(6), 1030–1033.
- Gangloff, S., McDonald, J. P., Bendixen, C., Arthur, L. & Rothstein, R. (1994). The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Molecular and cellular biology* 14(12), 8391–8398.
- Garnier, F. & Nadal, M. (2008). Transcriptional analysis of the two reverse gyrase encoding genes of *Sulfolobus solfataricus* P2 in relation to the growth phases and temperature conditions. *Extremophiles : life under extreme conditions* 12(6), 799–809.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D. & Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular biology of the cell* 11(12), 4241–4257.
- Gérard, E., Edmond, J., Prieur, D. & Forterre, P. (2001). DNA protection mechanisms are not involved in the radioresistance of the hyperthermophilic archaea *Pyrococcus abyssi* and *P. furiosus*. *molecular genetic genomics*. (266).
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H. & Nash, H. A. (1976). DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73(11), 3872–3876.
- Goldstein, E. & Drlica, K. (1984). Regulation of bacterial DNA supercoiling: plasmid linking numbers vary with growth temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81(13), 4046–4050.
- Götz, D., Paytubi, S., Munro, S., Lundgren, M., Bernander, R. & White, M. F. (2007). Responses of hyperthermophilic crenarchaea to UV irradiation. *Genome biology* 8(10), R220.
- Grayling, R. A., Sandman, K. & Reeve, J. N. (1996). Histones and chromatin structure in hyperthermophilic Archaea. *FEMS microbiology reviews* 18(2-3), 203–213.
- Grogan, D. W. (1989). Phenotypic characterization of the archaeobacterial genus *Sulfolobus*: comparison of five wild-type strains. *Journal of Bacteriology* 171(12), 6710–6719.
- Grogan, D. W. (1998). Hyperthermophiles and the problem of DNA instability. *Molecular Microbiology* 28(6), 1043–1049.
- Grogan, D. W., Carver, G. T. & Drake, J. W. (2001). Genetic fidelity under harsh conditions: analysis of spontaneous mutation in the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(14), 7928–7933.

- Guo, L., Feng, Y., Zhang, Z., Yao, H., Luo, Y., Wang, J. & Huang, L. (2007). Biochemical and structural characterization of Cren7, a novel chromatin protein conserved among Crenarchaea. *Nucleic Acids Research* 36(4), 1129–1137.
- Hamiche, A., Carot, V., Alilat, M., De Lucia, F., O'Donohue, M. F., Revet, B. & Prunell, A. (1996). Interaction of the histone (H3-H4)₂ tetramer of the nucleosome with positively supercoiled DNA minicircles: Potential flipping of the protein from a left- to a right-handed superhelical form. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(15), 7588–7593.
- Harmon, F. G., DiGate, R. J. & Kowalczykowski, S. C. (1999). RecQ helicase and topoisomerase III comprise a novel DNA strand passage function: a conserved mechanism for control of DNA recombination. *Molecular cell* 3(5), 611–620.
- Heck, M. M. & Earnshaw, W. C. (1986). Topoisomerase II: A specific marker for cell proliferation. *The Journal of cell biology* 103(6 Pt 2), 2569–2581.
- Heine, M. & Chandra, S. B. C. (2009). The linkage between reverse gyrase and hyperthermophiles: a review of their invariable association. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* 47(3), 229–234.
- Heinicke, I., Mller, J., Pittelkow, M. & Klein, A. (2004). Mutational analysis of genes encoding chromatin proteins in the archaeon *Methanococcus voltae* indicates their involvement in the regulation of gene expression. *Molecular Genetics and Genomics* 272(1).
- Henri, G. & Oshima, T. (2007). How nucleic acids cope with high temperature. (Gerday, C. & Glansdorff, N., Eds.) *ASM Press, Washington, D.C.* 39–58.
- Hiasa, H. (1994). Topoisomerase III, but Not Topoisomerase I, Can Support Nascent Chain Elongation during Theta-type DNA Replication. *The Journal of biological chemistry* 269(december 23), 32655–32659.
- Hiasa, H. & Marians, K. J. (1996). Two distinct modes of strand unlinking during theta-type DNA replication. *The Journal of biological chemistry* 271(35), 21529–21535.
- Hiasa, H., DiGate, R. J. & Marians, K. J. (1994). Decatenating activity of *Escherichia coli* DNA gyrase and topoisomerases I and III during *oriC* and pBR322 DNA replication in vitro. *The Journal of biological chemistry* 269(3), 2093–2099.
- Hickson, I. D. (2003). RecQ helicases: caretakers of the genome. *Nature Reviews Cancer* 3(3), 169–178.
- Higgins, C. F., Dorman, C. J., Stirling, D. A., Waddell, L., Booth, I. R., May, G. & Bremer, E. (1988). A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell* 52(4), 569–584.
- Hjort, K. & Bernander, R. (1999). Changes in cell size and DNA content in *Sulfolobus* cultures during dilution and temperature shift experiments. *Journal of Bacteriology* 181(18), 5669–5675.
- Hsieh, T.-S. & Capp, C. (2005). Nucleotide- and stoichiometry-dependent DNA supercoiling by reverse gyrase. *The Journal of biological chemistry* 280(21), 20467–20475.
- Hsieh, T.-S. & Plank, J. L. (2006). Reverse gyrase functions as a DNA renaturase: annealing of complementary single-stranded circles and positive supercoiling of a bubble substrate. *The Journal of biological chemistry* 281(9), 5640–5647.
- Huber, H., Hohn, M. J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C. & Stetter, K. O. (2002). A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417(6884), 63–67.
- Huet, J., Schnabel, R., Sentenac, A. & Zillig, W. (1983). Archaeobacteria and eukaryotes possess DNA-dependent RNA polymerases of a common type. *The EMBO journal* 2(8), 1291–1294.
- Hüdepohl, U., Reiter, W. D. & Zillig, W. (1990). In vitro transcription of two rRNA genes of the archaeobacterium *Sulfolobus* sp. B12 indicates a factor requirement for specific initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(15), 5851–5855.
- Impellizzeri, K. J., Anderson, B. & Burgers, P. M. (1991). The spectrum of spontaneous mutations in a *Saccharomyces cerevisiae* uracil-DNA-glycosylase mutant limits the function of this enzyme to cytosine deamination repair. *Journal of Bacteriology* 173(21), 6807–6810.
- Jacobs, K. L. & Grogan, D. W. (1997). Rates of spontaneous mutation in an archaeon from geothermal environments. *Journal of Bacteriology* 179(10), 3298–3303.

- Jaxel, C., Bouthier de la Tour, C., Duguet, M. & Nadal, M. (1996). Reverse gyrase gene from *Sulfolobus shibatae* B12: gene structure, transcription unit and comparative sequence analysis of the two domains. *Nucleic Acids Research* 24(23), 4668–4675.
- Jelinska, C., Conroy, M. J., Craven, C. J., Hounslow, A. M., Bullough, P. A., Waltho, J. P., Taylor, G. L. & White, M. F. (2005). Obligate heterodimerization of the archaeal Alba2 protein with Alba1 provides a mechanism for control of DNA packaging. *Structure* 13(7), 963–971.
- John W, W., Gary, C., Gary, B., Mark, R. & Rothstein, R. (1989). A Hyper-Recombination Mutation in *S. cerevisiae* Identifies a Novel Eukaryotic Topoisomerase. *Cell* 58, 409–419.
- Jolivet, E., Matsunaga, F., Ishino, Y., Forterre, P., Prieur, D. & Myllykallio, H. (2003). Physiological Responses of the Hyperthermophilic Archaeon “*Pyrococcus abyssi*” to DNA Damage Caused by Ionizing Radiation. *Journal of Bacteriology* 185(13), 3958–3961.
- Joshi, R. S., Piña, B. & Roca, J. (2010). Positional dependence of transcriptional inhibition by DNA torsional stress in yeast chromosomes. *The EMBO journal* 29(4), 740–748.
- Jun, S.-H., Reichlen, M. J., Tajiri, M. & Murakami, K. S. (2011). Archaeal RNA polymerase and transcription regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 46(1), 27–40.
- Kalliomaa-Sanford, A. K., Rodriguez-Castañeda, F. A., McLeod, B. N., Latorre-Roselló, V., Smith, J. H., Reimann, J., Albers, S. V. & Barilla, D. (2012). Chromosome segregation in Archaea mediated by a hybrid DNA partition machine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(10), 3754–3759.
- Kampmann, M. & Stock, D. (2004). Reverse gyrase has heat-protective DNA chaperone activity independent of supercoiling. *Nucleic Acids Research* 32(12), 3537–3545.
- Karran, P. & Lindahl, T. (1980). Hypoxanthine in deoxyribonucleic acid: generation by heat-induced hydrolysis of adenine residues and release in free form by a deoxyribonucleic acid glycosylase from calf thymus. *Biochemistry* 19(26), 6005–6011.
- Kashefi, K. & Lovley, D. R. (2003). Extending the upper temperature limit for life. *Science* 301(5635), 934.
- Kato, J., Suzuki, H. & Ikeda, H. (1992). Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 267(36), 25676–25684.
- Kelman, Z. & White, M. F. (2005). Archaeal DNA replication and repair. *Current Opinion in Microbiology* 8(6), 669–676.
- Khodursky, A. B., Peter, B. J., Schmid, M. B., DeRisi, J., Botstein, D., Brown, P. O. & Cozzarelli, N. R. (2000). Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of DNA microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(17), 9419–9424.
- Khodursky, A. B., Zechiedrich, E. L. & Cozzarelli, N. R. (1995). Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(25), 11801–11805.
- Kikuchi, A. & Asai, K. (1984). Reverse gyrase—a topoisomerase which introduces positive superhelical turns into DNA. *Nature* 309(5970), 677–681.
- Kim, R. A. & Wang, J. C. (1989). Function of DNA topoisomerases as replication swivels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology* 208(2), 257–267.
- Kozubal, M. A., Romine, M., Jennings, R. D., Jay, Z. J., Tringe, S. G., Rusch, D. B., Beam, J. P., McCue, L. A. & Inskeep, W. P. (2012). Geoarchaeota: a new candidate phylum in the Archaea from high-temperature acidic iron mats in Yellowstone National Park. *The ISME Journal* 7(3), 622–634 Nature Publishing Group.
- Kusano, S., Ding, Q., Fujita, N. & Ishihama, A. (1996). Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase E sigma 70 and E sigma 38 holoenzymes. *The Journal of biological chemistry* 271(4), 1998–2004.
- Langer, D., Hain, J., Thuriaux, P. & Zillig, W. (1995). Transcription in archaea: similarity to that in eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(13), 5768–5772.
- Le Cam E, Culard, F., Larquet, E., Delain, E. & Cagnet, J. A. (1999). DNA bending induced by the archaeobacterial histone-like protein MC1. *Journal of Molecular Biology* 285(3), 1011–1021.

- Li, X., Guo, L., Deng, L., Feng, D., Ren, Y., Chu, Y., She, Q. & Huang, L. (2011). Deletion of the topoisomerase III gene in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus islandicus* results in slow growth and defects in cell cycle control. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao* 38(6), 253–259 Elsevier Limited and Science Press.
- Lim, H. M., Lewis, D. E. A., Lee, H. J., Liu, M. & Adhya, S. (2003). Effect of varying the supercoiling of DNA on transcription and its regulation. *Biochemistry* 42(36), 10718–10725.
- Lin, H.-K., Chase, S. F., Laue, T. M., Jen-Jacobson, L. & Trakselis, M. A. (2012). Differential temperature-dependent multimeric assemblies of replication and repair polymerases on DNA increase processivity. *Biochemistry* 51(37), 7367–7382.
- Lindahl, T. (1974). An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71(9), 3649–3653.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362(6422), 709–715.
- Lindahl, T. (2013). My journey to DNA repair. *Genomics, proteomics & bioinformatics* 11(1), 2–7.
- Lindahl, T. & Nyberg, B. (1974). Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 13(16), 3405–3410.
- Lindahl, T., Karran, P. & Wood, R. D. (1997). DNA excision repair pathways. *Current Opinion in Genetics & Development* 7(2), 158–169.
- Lindås, A.-C., Karlsson, E. A., Lindgren, M. T., Ettema, T. J. G. & Bernander, R. (2008). A unique cell division machinery in the Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(48), 18942–18946.
- Liu, L. F. & Wang, J. C. (1987). Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(20), 7024–7027.
- Lockshon, D. & Morris, D. R. (1983). Positively supercoiled plasmid DNA is produced by treatment of *Escherichia coli* with DNA gyrase inhibitors. *Nucleic Acids Research* 11(10), 2999–3017.
- Lopez, C. R., Yang, S., Deibler, R. W., Ray, S. A., Pennington, J. M., Digate, R. J., Hastings, P. J., Rosenberg, S. M. & Zechiedrich, E. L. (2005). A role for topoisomerase III in a recombination pathway alternative to RuvABC. *Molecular Microbiology* 58(1), 80–101.
- López-García, P. & Forterre, P. (1997). DNA topology in hyperthermophilic archaea: reference states and their variation with growth phase, growth temperature, and temperature stresses. *Molecular Microbiology* 23(6), 1267–1279.
- López-García, P. & Forterre, P. (1999). Control of DNA topology during thermal stress in hyperthermophilic archaea: DNA topoisomerase levels, activities and induced thermotolerance during heat and cold shock in *Sulfolobus*. *Molecular Microbiology* 33(4), 766–777.
- López-García, P., Knapp, S., Ladenstein, R. & Forterre, P. (1998). In vitro DNA binding of the archaeal protein Sso7d induces negative supercoiling at temperatures typical for thermophilic growth. *Nucleic Acids Research* 26(10), 2322–2328.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389(6648), 251–260.
- Luijsterburg, M. S., White, M. F., van Driel, R. & Dame, R. T. (2008). The Major Architects of Chromatin: Architectural Proteins in Bacteria, Archaea and Eukaryotes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 43(6), 393–418.
- Lundgren, M. & Bernander, R. (2007). Genome-wide transcription map of an archaeal cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(8), 2939–2944.
- Lundgren, M., Andersson, A., Chen, L., Nilsson, P. & Bernander, R. (2004). Three replication origins in *Sulfolobus* species: synchronous initiation of chromosome replication and asynchronous termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(18), 7046–7051.
- Lurz, R., Grote, M., Dijk, J., Reinhardt, R. & Dobrinski, B. (1986). Electron microscopic study of DNA complexes with proteins from the Archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *The EMBO journal* 5(13), 3715–3721.

- Marguet, E. & Forterre, P. (1994). DNA stability at temperatures typical for hyperthermophiles. *Nucleic Acids Research* 22(9), 1681–1686.
- Marmur, J. & Doty, P. (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *Journal of Molecular Biology* 5, 109–118.
- Marsh, T. L., Reich, C. I., Whitelock, R. B. & Olsen, G. J. (1994). Transcription factor IID in the Archaea: sequences in the *Thermococcus celer* genome would encode a product closely related to the TATA-binding protein of eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(10), 4180–4184.
- Massé, E. & Drolet, M. (1999). Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *The Journal of biological chemistry* 274(23), 16654–16658.
- Matsunaga, F., Forterre, P., Ishino, Y. & Myllykallio, H. (2001). In vivo interactions of archaeal Cdc6/Orc1 and minichromosome maintenance proteins with the replication origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(20), 11152–11157.
- Menzel, R. & Gellert, M. (1983). Regulation of the genes for *E. coli* DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling. *Cell* 34(1), 105–113.
- Michel, B. (2000). Replication fork arrest and DNA recombination. *Trends in biochemical sciences* 25(4), 173–178.
- Mirambeau, G., Duguet, M. & Forterre, P. (1984). ATP-dependent DNA topoisomerase from the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. Relaxation of supercoiled DNA at high temperature. *Journal of Molecular Biology* 179(3), 559–563.
- Mizutani, M., Ohta, T., Watanabe, H., Handa, H. & Hirose, S. (1991). Negative supercoiling of DNA facilitates an interaction between transcription factor IID and the fibroin gene promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(3), 718–722.
- Mondal, N. & Parvin, J. D. (2001). DNA topoisomerase II α is required for RNA polymerase II transcription on chromatin templates. *Nature* 413(6854), 435–438.
- Mondal, N., Zhang, Y., Jonsson, Z., Dhar, S. K., Kannapiran, M. & Parvin, J. D. (2003). Elongation by RNA polymerase II on chromatin templates requires topoisomerase activity. *Nucleic Acids Research* 31(17), 5016–5024.
- Mudgil, Y., Singh, B., Upadhyaya, K., Sopory, S., & Reddy, M. (2002). Cloning and characterization of a cell cycle-regulated gene encoding Topoisomerase I from *Nicotiana tabacum* that is inducible by light, low temperature and abscisic acid. *Molecular Genetics and Genomics* 267(3), 380–390.
- Musgrave, D. R., Sandman, K. M. & Reeve, J. N. (1991). DNA binding by the archaeal histone Hmf results in positive supercoiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(23), 10397–10401.
- Musgrave, D., Forterre, P. & Slesarev, A. (2000). Negative constrained DNA supercoiling in archaeal nucleosomes. *Molecular Microbiology* 35(2), 341–349.
- Myllykallio, H. (2000). Bacterial Mode of Replication with Eukaryotic-Like Machinery in a Hyperthermophilic Archaeon. *Science* 288(5474), 2212–2215.
- Nadal, M. (2007). Reverse gyrase: an insight into the role of DNA-topoisomerases. *Biochimie* 89(4), 447–455.
- Nadal, M., Mirambeau, G., Forterre, P., Reiter, W.-D. & Duguet, M. (1986). Positively supercoiled DNA in a virus-like particle of an archaeobacterium. *Nature* 321(6067), 256–258.
- Nakasu, S. & Kikuchi, A. (1985). Reverse gyrase; ATP-dependent type I topoisomerase from *Sulfolobus*. *The EMBO journal* 4(10), 2705–2710.
- Napoli, A., Valenti, A., Salerno, V., Nadal, M., Garnier, F., Rossi, M. & Ciaramella, M. (2004). Reverse gyrase recruitment to DNA after UV light irradiation in *Sulfolobus solfataricus*. *The Journal of biological chemistry* 279(32), 33192–33198.
- Napoli, A., Valenti, A., Salerno, V., Nadal, M., Garnier, F., Rossi, M. & Ciaramella, M. (2005). Functional interaction of reverse gyrase with single-strand binding protein of the archaeon *Sulfolobus*. *Nucleic Acids Research* 33(2), 564–576.

- Napoli, A., Zivanovic, Y., Bocs, C., Buhler, C., Rossi, M., Forterre, P. & Ciaramella, M. (2002). DNA bending, compaction and negative supercoiling by the architectural protein Sso7d of *Sulfolobus solfataricus*. *Nucleic Acids Research* 30(12), 2656–2662.
- Nichols, M. D., DeAngelis, K., Keck, J. L. & Berger, J. M. (1999). Structure and function of an archaeal topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination factor Spo11. *The EMBO journal* 18(21), 6177–6188.
- Norais, C., Hawkins, M., Hartman, A. L., Eisen, J. A., Myllykallio, H. & Allers, T. (2007). Genetic and physical mapping of DNA replication origins in *Haloferax volcanii*. *PLoS genetics* 3(5), e77.
- Norman-Axelsson, U., Durand-Dubief, M., Prasad, P. & Ekwall, K. (2013). DNA topoisomerase III localizes to centromeres and affects centromeric CENP-A levels in fission yeast. (Norman-Axelsson, U., Durand-Dubief, M., Prasad, P., & Ekwall, K., Eds.) *PLoS genetics* 9(3), e1003371.
- Nunoura, T., Takaki, Y., Kakuta, J., Nishi, S., Sugahara, J., Kazama, H., Chee, G.-J., Hattori, M., Kanai, A., Atomi, H., Takai, K. & Takami, H. (2011). Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Nucleic Acids Research* 39(8), 3204–3223.
- Nurse, P., Levine, C., Hassing, H. & Marians, K. J. (2003). Topoisomerase III can serve as the cellular decatenase in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 278(10), 8653–8660.
- Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R. & Stahl, D. A. (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Review of Microbiology* 40, 337–365.
- Pace, N. R., Sapp, J. & Goldenfeld, N. (2012). Classic Perspective: Phylogeny and beyond: Scientific, historical, and conceptual significance of the first tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(4), 1011–1018.
- Pavlov, N. A., Cherny, D. I., Nazimov, I. V., Slesarev, A. I. & Subramaniam, V. (2002). Identification, cloning and characterization of a new DNA-binding protein from the hyperthermophilic methanogen *Methanopyrus kandleri*. *Nucleic Acids Research* 30(3), 685–694.
- Peak, M. J., Robb, F. T. & Peak, J. G. (1995). Extreme resistance to thermally induced DNA backbone breaks in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Bacteriology* 177(21), 6316–6318.
- Peng, H. & Marians, K. J. (1993). Decatenation activity of topoisomerase IV during *oriC* and pBR322 DNA replication in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(18), 8571–8575.
- Perugino, G., Valenti, A., D'Amaro, A., Rossi, M. & Ciaramella, M. (2009). Reverse gyrase and genome stability in hyperthermophilic organisms. 37(Pt 1), 69–73.
- Peter, B. J., Arsuaga, J., Breier, A. M., Khodursky, A. B., Brown, P. O. & Cozzarelli, N. R. (2004). Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. *Genome biology* 5(11), R87.
- Postow, L., Hardy, C. D., Arsuaga, J. & Cozzarelli, N. R. (2004). Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes & development* 18(14), 1766–1779.
- Postow, L., Ullsperger, C., Keller, R. W., Bustamante, C., Vologodskii, A. V. & Cozzarelli, N. R. (2001). Positive torsional strain causes the formation of a four-way junction at replication forks. *The Journal of biological chemistry* 276(4), 2790–2796.
- Pruss, G. J., Franco, R. J., Chevalier, S. G., Manes, S. H. & Drlica, K. (1986). Effects of DNA gyrase inhibitors in *Escherichia coli* topoisomerase I mutants. *Journal of Bacteriology* 168(1), 276–282.
- Pruss, G. J., Manes, S. H. & Drlica, K. (1982). *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell* 31(1), 35–42.
- Quaiser, A., Constantinesco, F., White, M. F., Forterre, P. & Elie, C. (2008). The Mre11 protein interacts with both Rad50 and the HerA bipolar helicase and is recruited to DNA following gamma irradiation in the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *BMC Molecular Biology* 9(1), 25.
- Qureshi, S. A., Baumann, P., Rowlands, T., Khoo, B. & Jackson, S. P. (1995). Cloning and functional analysis of the TATA binding protein from *Sulfolobus shibatae*. *Nucleic Acids Research* 23(10), 1775–1781.

- Qureshi, S. A., Bell, S. D. & Jackson, S. P. (1997). Factor requirements for transcription in the Archaeon *Sulfolobus shibatae*. *The EMBO journal* 16(10), 2927–2936.
- Rajan, R., Prasad, R., Taneja, B., Wilson, S. H. & Mondragón, A. (2013). Identification of one of the apurinic/apyrimidinic lyase active sites of topoisomerase V by structural and functional studies. *Nucleic Acids Research* 41(1), 657–666.
- Raji, A., Zabel, D. J., Laufer, C. S. & Depew, R. E. (1985). Genetic analysis of mutations that compensate for loss of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *Journal of Bacteriology* 162(3), 1173–1179.
- Reeve, J. N., Sandman, K. & Daniels, C. J. (1997). Archaeal histones, nucleosomes, and transcription initiation. *Cell* 89(7), 999–1002.
- Robertson, C. E., Harris, J. K., Spear, J. R. & Pace, N. R. (2005). Phylogenetic diversity and ecology of environmental Archaea. *Current Opinion in Microbiology* 8(6), 638–642.
- Robinson, N. P. & Bell, S. D. (2007). Extrachromosomal element capture and the evolution of multiple replication origins in archaeal chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(14), 5806–5811.
- Robinson, N. P., Dionne, I., Lundgren, M., Marsh, V. L., Bernander, R. & Bell, S. D. (2004). Identification of two origins of replication in the single chromosome of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Cell* 116(1), 25–38.
- Rodríguez, A. C. (2003). Investigating the Role of the Latch in the Positive Supercoiling Mechanism of Reverse Gyrase †. *Biochemistry* 42(20), 5993–6004.
- Rolfsmeier, M. L., Laughery, M. F. & Haseltine, C. A. (2011). Repair of DNA double-strand breaks induced by ionizing radiation damage correlates with upregulation of homologous recombination genes in *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Molecular Biology* 414(4), 485–498.
- Rothschild, L. J. & Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature* 409(6823), 1092–1101.
- Rouviere-Yaniv, J. & Gros, F. (1975). Characterization of a novel, low-molecular-weight DNA-binding protein from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(9), 3428–3432.
- Rowlands, T., Baumann, P. & Jackson, S. P. (1994). The TATA-Binding Protein: A General Transcription Factor in Eukaryotes and Archaeobacteria. *Science* 264, 1326–1329.
- Samson, R. Y. & Bell, S. D. (2011). Cell cycles and cell division in the archaea. *Current Opinion in Microbiology* 14(3), 350–356 Elsevier Ltd.
- Samson, R. Y., Obita, T., Freund, S. M., Williams, R. L. & Bell, S. D. (2008). A Role for the ESCRT System in Cell Division in Archaea. *Science* 322(5908), 1710–1713.
- Samson, R. Y., Xu, Y., Gadelha, C., Stone, T. A., Faqiri, J. N., Li, D., Qin, N., Pu, F., Liang, Y. X., She, Q. & Bell, S. D. (2013). Specificity and Function of Archaeal DNA Replication Initiator Proteins. *CellReports* 3(2), 485–496 The Authors.
- Sandman, K., Krzycki, J. A., Dobrinski, B., Lurz, R. & Reeve, J. N. (1990). Hmf, a DNA-binding protein isolated from the hyperthermophilic archaeon *Methanothermus fervidus*, is most closely related to histones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(15), 5788–5791.
- Schnabel, R., Thomm, M., Gerardy-Schahn, R., Zillig, W., Stetter, K. O. & Huet, J. (1983). Structural homology between different archaeobacterial DNA-dependent RNA polymerases analyzed by immunological comparison of their components. *The EMBO journal* 2(5), 751–755.
- Seol, Y., Gentry, A. C., Osheroff, N. & Neuman, K. C. (2013). Chiral discrimination and writhe dependent relaxation mechanism of human topoisomerase II α . *Journal of Biological Chemistry*.
- She, Q., Singh, R. K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M. J., Chan-Weiher, C. C., Clausen, I. G., Curtis, B. A., De Moors, A., Erauso, G., Fletcher, C., Gordon, P. M., Heikamp-de Jong, I., Jeffries, A. C., Kozera, C. J., Medina, N., Peng, X., Thi-Ngoc, H. P., Redder, P., Schenk, M. E., Theriault, C., Tolstrup, N., Charlebois, R. L., Doolittle, W. F., Duguet, M., Gaasterland, T., Garrett, R. A., Ragan, M. A., Sensen, C. W. & Van der Oost, J. (2001). The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(14), 7835–7840.

- Sinden, R. R., Carlson, J. O. & Pettijohn, D. E. (1980). Torsional tension in the DNA double helix measured with trimethylpsoralen in living *E. coli* cells: analogous measurements in insect and human cells. *Cell* 21(3), 773–783.
- Slesarev, A. I. & Kozyavkin, S. A. (1990). DNA substrate specificity of reverse gyrase from extremely thermophilic archaeobacteria. *Journal of biomolecular structure & dynamics* 7(4), 935–942.
- Slesarev, A. I., Lake, J. A., Stetter, K. O., Gellert, M. & Kozyavkin, S. A. (1994). Purification and characterization of DNA topoisomerase V. *The Journal of biological chemistry* 269(5), 3295–3303.
- Stanier, R. Y. & Van Niel, C. B. (1962). The concept of a bacterium. *Archiv für Mikrobiologie* 42, 17–35.
- Steck, T. R. & Drlica, K. (1984). Bacterial chromosome segregation: evidence for DNA gyrase involvement in decatenation. *Cell* 36(4), 1081–1088.
- Stetter, K. O., G, F., Huber, R. & A, S. (1990). Hyperthermophilic microorganisms. *FEMS microbiology reviews* 75, 117–124.
- Tabuchi, H. & Hirose, S. (1988). DNA supercoiling facilitates formation of the transcription initiation complex on the fibroin gene promoter. *The Journal of biological chemistry* 263(30), 15282–15287.
- Takayanagi, S., Morimura, S., Kusaoke, H., Yokoyama, Y., Kano, K. & Shioda, M. (1992). Chromosomal structure of the halophilic archaeobacterium *Halobacterium salinarium*. *Journal of Bacteriology* 174(22), 7207–7216.
- Taneja, B., Patel, A., Slesarev, A. & Mondragón, A. (2006). Structure of the N-terminal fragment of topoisomerase V reveals a new family of topoisomerases. *The EMBO journal* 25(2), 398–408.
- Terekhova, K., Gunn, K. H., Marko, J. F. & Mondragon, A. (2012). Bacterial topoisomerase I and topoisomerase III relax supercoiled DNA via distinct pathways. *Nucleic Acids Research* 40(20), 10432–10440.
- Terekhova, K., Marko, J. F. & Mondragón, A. (2013). Studies of bacterial topoisomerases I and III at the single-molecule level. *Biochemical Society Transactions* 41(2), 571–575.
- Terui, Y., Ohnuma, M., Hiraga, K., Kawashima, E. & Oshima, T. (2005). Stabilization of nucleic acids by unusual polyamines produced by an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Biochemical Journal* 388(Pt 2), 427–433.
- Teysier, C., Laine, B., Gervais, A., Maurizot, J. C. & Culard, F. (1994). Archaeobacterial histone-like protein MC1 can exhibit a sequence-specific binding to DNA. *Biochemical Journal* 303 (Pt 2), 567–573.
- Teysier, C., Toulmé, F., Touzel, J. P., Gervais, A., Maurizot, J. C. & Culard, F. (1996). Preferential binding of the archaeobacterial histone-like MC1 protein to negatively supercoiled DNA minicircles. *Biochemistry* 35(24), 7954–7958.
- Travers, A. & Muskhelishvili, G. (2005). DNA supercoiling — a global transcriptional regulator for enterobacterial growth? *Nature Reviews Microbiology* 3(2), 157–169.
- Travers, A. & Muskhelishvili, G. (2007). A common topology for bacterial and eukaryotic transcription initiation? *EMBO reports* 8(2), 147–151.
- Trent, J. D., Chastain, R. A. & Yayanos, A. A. (1984). Possible artefactual basis for apparent bacterial growth at 250 degrees C. *Nature* 307(5953), 737–740.
- Tse-Dinh, Y. C. (1985). Regulation of the *Escherichia coli* DNA topoisomerase I gene by DNA supercoiling. *Nucleic Acids Research* 13(13), 4751–4763.
- Tse-Dinh, Y. C. (1998). Bacterial and archeal type I topoisomerases. *Biochimica et biophysica acta* 1400(1-3), 19–27.
- Tse-Dinh, Y. C., Qi, H. & Menzel, R. (1997). DNA supercoiling and bacterial adaptation: thermotolerance and thermoresistance. *Trends in Microbiology* 5(8), 323–326.
- Tuteja, N., Reddy, M. K., Mudgil, Y., Yadav, B. S., Chandok, M. R. & Sopory, S. K. (2003). Pea DNA topoisomerase I is phosphorylated and stimulated by casein kinase 2 and protein kinase C. *Plant physiology* 132(4), 2108–2115.
- Valenti, A., De Felice, M., Perugino, G., Bizard, A., Nadal, M., Rossi, M. & Ciaramella, M. (2012). Synergic and opposing activities of thermophilic RecQ-like helicase and Topoisomerase 3 in Holliday junction processing and replication fork stabilization. *Journal of Biological Chemistry*.

- Valenti, A., Napoli, A., Ferrara, M. C., Nadal, M., Rossi, M. & Ciaramella, M. (2006). Selective degradation of reverse gyrase and DNA fragmentation induced by alkylating agent in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Nucleic Acids Research* 34(7), 2098–2108.
- Valenti, A., Perugino, G., Nohmi, T., Rossi, M. & Ciaramella, M. (2009). Inhibition of translesion DNA polymerase by archaeal reverse gyrase. *Nucleic Acids Research* 37(13), 4287–4295.
- Valenti, A., Perugino, G., Varriale, A., D'Auria, S., Rossi, M. & Ciaramella, M. (2010). The archaeal topoisomerase reverse gyrase is a helix-destabilizing protein that unwinds four-way DNA junctions. *Journal of Biological Chemistry* 285(47), 36532–36541.
- Viguera, E., Hernández, P., Krimer, D. B., Lurz, R. & Schwartzman, J. B. (2000). Visualisation of plasmid replication intermediates containing reversed forks. *Nucleic Acids Research* 28(2), 498–503.
- Vindigni, A. & Hickson, I. D. (2009). RecQ helicases: multiple structures for multiple functions? *HFSP journal* 3(3), 153–164.
- Wang, H.-C., Susko, E. & Roger, A. J. (2006). On the correlation between genomic G+C content and optimal growth temperature in prokaryotes: data quality and confounding factors. *Biochemical and biophysical research communications* 342(3), 681–684.
- Wang, J. C. (1996). DNA Topoisomerases. *Annual review of biochemistry* 65(1), 635–692 Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA.
- Wang, J. C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3(6), 430–440.
- Wang, J. Y. & Syvanen, M. (1992). DNA twist as a transcriptional sensor for environmental changes. *Molecular Microbiology* 6(14), 1861–1866.
- Watson, J. D. & Crick, F. H. (1953a). Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171(4361), 964–967.
- Watson, J. D. & Crick, F. H. (1953b). *Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. The American journal of psychiatry* pp 737–738 nature.
- Werner, F. (2008). Structural evolution of multisubunit RNA polymerases. *Trends in Microbiology* 16(6), 247–250.
- White, M. F. & Bell, S. D. (2002). Holding it together: chromatin in the Archaea. *Trends in genetics : TIG* 18(12), 621–626.
- White, R. H. (1984). Hydrolytic stability of biomolecules at high temperatures and its implication for life at 250 degrees C. *Nature* 310(5976), 430–432.
- Wilkins, M. H., Seeds, W. E., Stokes, A. R. & Wilson, H. R. (1953). Helical structure of crystalline deoxypentose nucleic acid. *Nature* 172(4382), 759–762.
- Winter, J. A. & Bunting, K. A. (2012). Rings in the Extreme: PCNA Interactions and Adaptations in the Archaea. *Archaea (Vancouver, B.C.)* 2012(3), 1–8.
- Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(11), 5088–5090.
- Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(12), 4576–4579.
- Wu, H. Y., Shyy, S. H., Wang, J. C. & Liu, L. F. (1988). Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell* 53(3), 433–440.
- Wu, L. (2007). Role of the BLM helicase in replication fork management. *DNA repair* 6(7), 936–944.
- Wu, L. & Hickson, I. D. (2006). DNA Helicases Required for Homologous Recombination and Repair of Damaged Replication Forks. *Annual Review of Genetics* 40(1), 279–306.
- Xue, H., Guo, R., Wen, Y., Liu, D. & Huang, L. (2000). An abundant DNA binding protein from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae* affects DNA supercoiling in a temperature-dependent fashion. *Journal of Bacteriology* 182(14), 3929–3933.

- Yang, H., Fitz-Gibbon, S., Marcotte, E. M., Tai, J. H., Hyman, E. C. & Miller, J. H. (2000). Characterization of a thermostable DNA glycosylase specific for U/G and T/G mismatches from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Journal of Bacteriology* 182(5), 1272–1279.
- Zechiedrich, E. L. & Cozzarelli, N. R. (1995). Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes & development* 9(22), 2859–2869.
- Zechiedrich, E. L., Khodursky, A. B., Bachellier, S., Schneider, R., Chen, D., Lilley, D. M. & Cozzarelli, N. R. (2000). Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 275(11), 8103–8113.
- Zhang, C., Tian, B., Li, S., Ao, X., Dalgaard, K., Gökce, S., Liang, Y. & She, Q. (2013). Genetic manipulation in *Sulfolobus islandicus* and functional analysis of DNA repair genes. *Biochemical Society Transactions* 41(1), 405–410.
- Zillig, W., Palm, P., Reiter, W. D., Gropp, F., Pühler, G. & Klenk, H. P. (1988). Comparative evaluation of gene expression in archaebacteria. *European journal of biochemistry / FEBS* 173(3), 473–482.
- Zillig, W., Stetter, K. O. & Tobien, M. (1978). DNA-dependent RNA polymerase from *Halobacterium halobium*. *European journal of biochemistry / FEBS* 91(1), 193–199.
- Zillig, W., Stetter, K. O., Wunderl, S., Schulz, W., Priess, H. & Scholz, I. (1980). The *Sulfolobus*-“*Caldariella*” group: Taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerases. *Arch. Microbiol.* 125, 259–269.
- Zuckerandl, E. & Pauling, L. (1965). Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of theoretical biology* 8(2), 357–366.