

## NucS et le mécanisme MMR chez *Streptomyces* : la réparation de l'ADN est-elle source de cassures double-brin de l'ADN ?

**Laboratoire d'accueil** : Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne (DynAMic) UMR UL-INRA 1128, Faculté des Sciences et Technologies, FR EFABA, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy

**Encadrants** : Pierre Leblond, Claire Bertrand et Annabelle Thibessard

**Résumé** : La plasticité génétique remarquable du chromosome linéaire des bactéries du genre *Streptomyces* découle de la réorganisation, de la perte et du gain (transfert horizontal) de séquences génomiques. Au laboratoire DynAMic, nous avons montré que lorsque l'on induit artificiellement des cassures double-brin de l'ADN (CDB), leur réparation (par recombinaison homologue et/ou par recombinaison illégitime) initie des remaniements génomiques de grande ampleur (délétion, circularisation, amplification). Parmi les causes physiologiques de l'apparition de CDB dans le chromosome, NucS qui serait un acteur du mécanisme de correction de mésappariements dans l'ADN pourrait être à l'origine de certaines de ces cassures, et participer à la plasticité.

Les *Streptomyces* sont des bactéries du sol dont le génome est constitué d'un grand chromosome linéaire (de l'ordre de 6-12 Mb) particulièrement sujet aux réarrangements, engendrant une plasticité génétique pouvant favoriser la grande capacité d'adaptation et de colonisation de cette bactérie.

Les *Streptomyces* disposent d'au moins deux mécanismes de réparation des cassures double-brin : un mécanisme de recombinaison homologue et un système de réparation illégitime (NHEJ pour Non Homologous End Joining) (Hoff *et al.* 2017, Hoff *et al.* 2018). Dernièrement, le laboratoire a caractérisé leurs acteurs ainsi que leur implication dans les événements de remaniement de grande ampleur (Hoff *et al.* 2016 ; Hoff *et al.* 2017 ; Hoff *et al.* 2018).

Ces travaux antérieurs ont conduit à la construction de contextes génétiques déficients pour ces mécanismes de réparation de notre souche d'étude : *Streptomyces ambofaciens*.

La forte fréquence de remaniements observée chez les *Streptomyces* pourrait ainsi être associée à une forte fréquence d'apparition de ces cassures. De récentes études ont mis en évidence chez des archées une nouvelle endonucléase nommée NucS ou EndoMS impliquée dans un mécanisme de réparation des mésappariements et qui interviendrait par la formation de cassures double-brin (Ishino *et al.* 2016 ; Nakae *et al.* 2016 ; Ren *et al.* 2009). Un orthologue est-il conservé chez toutes les souches/espèces du genre *Streptomyces*. L'objectif du stage proposé ici est de créer chez *Streptomyces ambofaciens* deux contextes génétiques différents concernant *nucS* : des mutants délétés de *nucS* et des mutants le surexprimant, dans le but de tester le lien éventuel entre l'activité de cette enzyme et la variabilité génomique de *Streptomyces* :

- Tout d'abord, le suivi du taux de mutagenèse (apparition spontanée de variants résistants à la rifampicine par exemple) des mutants *nucS* relativement à la référence sauvage permettra de confirmer que NucS est un acteur majeur de la réparation des mésappariements.
- Puis, la fréquence d'apparition de mutants réarrangés en fonction du niveau d'expression de *nucS* et du contexte génétique (Contexte efficient ou déficient pour la recombinaison homologue et/ou illégitime) permettra de questionner l'implication de NucS dans la génération de CDB à l'origine de remaniements chromosomiques.

**Mots Clés** : *Streptomyces*, cassures double-brin, *nucS*, délétion, surexpression, phénotype mutateur

### References :

Hoff G., **Bertrand C.**, Piotrowski E., **Thibessard A.**, **Leblond P.** Genome plasticity is governed by double strand break DNA repair in *Streptomyces*. *Sci Rep.*8(1):5272 (2018)

Hoff G., **Bertrand C.**, Zhang L., Piotrowski E., Chipot L., Bontemps C., Confalonieri F., McGovern S., Lecointe F., **Thibessard A.**, **Leblond P.** Multiple and variable NHEJ-like genes are involved in resistance to DNA damage in *Streptomyces ambofaciens*. *Front Microbiol.* 28(7):1901 (2016)

Hoff G., **Bertrand C.**, Piotrowski E., **Thibessard A.**, **Leblond P.** Implication of RuvABC and RecG in homologous recombination in *Streptomyces ambofaciens*. *Res Microbiol.* 168(1):26-35 (2017)

Ishino S, Nishi Y, Oda S, Uemori T, Sagara T, Takatsu N, Yamagami T, Shirai T, Ishino Y. Identification of a mismatch-specific endonuclease in hyperthermophilic Archaea. *Nucleic Acids Res.* 2016 Apr 20;44(7):2977-86.

Nakae S, Hijikata A, Tsuji T, Yonezawa K, Kouyama KI, Mayanagi K, Ishino S, Ishino Y, Shirai T. Structure of the EndoMS-DNA Complex as Mismatch Restriction Endonuclease. *Structure.* 2016 Nov 1;24(11):1960-1971.

Ren B, Kühn J, Meslet-Cladiere L, Briffotiaux J, Norais C, Lavigne R, Flament D, Ladenstein R, Myllykallio H. Structure and function of a novel endonuclease acting on branched DNA substrates. *EMBO J.* 2009 Aug 19;28(16):2479-89.

### **Contacts :**

[pierre.leblond@univ-lorraine.fr](mailto:pierre.leblond@univ-lorraine.fr)

[annabelle.thibessard@univ-lorraine.fr](mailto:annabelle.thibessard@univ-lorraine.fr)

[claire.bertrand@univ-lorraine.fr](mailto:claire.bertrand@univ-lorraine.fr)

### **Bibliographie des encadrants depuis 2013:**

- Ne me cassez pas les chromosomes ! P. Leblond The Conversation, 9 septembre 2018.
- Hoff G., Bertrand C., Piotrowski E., Thibessard A., Leblond P. Genome plasticity is governed by double strand break DNA repair in *Streptomyces*. *Sci Rep.*8(1):5272 (2018)
- Hoff G., Bertrand C., Zhang L., Piotrowski E., Chipot L., Bontemps C., Confalonieri F., McGovern S., Lecointe F., Thibessard A., Leblond P. Multiple and variable NHEJ-like genes are involved in resistance to DNA damage in *Streptomyces ambofaciens*. *Front Microbiol.* 28(7):1901 (2016)
- Hoff G., Bertrand C., Piotrowski E., Thibessard A., Leblond P. Implication of RuvABC and RecG in homologous recombination in *Streptomyces ambofaciens*. *Res Microbiol.* 168(1):26-35 (2017)
- Thibessard A., Leblond P. Complete Genome Sequence of *Streptomyces ambofaciens* DSM 40697, a Paradigm for Genome Plasticity Studies. *Genome Announc.* 4(3):00470-16 (2016)
- Thibessard A., Bertrand C., Hiblot J., Piotrowski E., Leblond P. Construction of pDYN6902, a new *Streptomyces* integrative expression vector designed for cloning sequences interfering with *Escherichia coli* viability. *Plasmid.* 82:43-9 (2015)
- Thibessard A\*, Haas Drago\*, Gerbaud C, Aigle B, Lautru S, Pernodet J-L and Leblond P. Complete genome sequence of *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877, the spiramycin producer. *Journal of Biotechnology.* 214:117-8 (2015). \* Co-premiers auteurs
- Zhang L, Nguyen HC, Chipot L, Piotrowski E, Bertrand C, Thibessard A, Leblond P. The *adnAB* locus, encoding a putative helicase-nuclease activity, is essential in *Streptomyces*. *J Bacteriol* 196(14):2701-8 (2014)
- Bontemps C., Toussaint M., Revol P.-V., Hotel L., Jeanbille M., Uroz S., Turpault M.-P., Blaudez D., P. Leblond. Taxonomic and functional diversity of *Streptomyces* in a forest soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 342(2):157-67 (2013).
- Holmes N.A., Walshaw J., Leggett R.M., Thibessard A., Dalton K.A., Gillespie M.D., Hemmings A.M., Gust B., Kelemen G.H. Coiled-coil protein Scy is a key component of a multiprotein assembly controlling polarized growth in *Streptomyces*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(5):E397-406 (2013)

---

### **NucS in *Streptomyces* MMR repair: is DNA repair a source of double strand breaks?**

**Host lab:** Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne (DynAMic) UMR UL- INRA 1128, Faculté des Sciences et Technologies, FR EFABA, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy

**Supervision:** Claire Bertrand, Annabelle Thibessard, Pierre Leblond.

**Abstract:** Genome plasticity is a hallmark of the soil bacteria *Streptomyces* resulting from rearrangement, loss or gain (horizontal gene transfer) of genomic sequences. In our lab, we recently showed that inducing double strand breaks in the chromosome triggers the formation of huge chromosome rearrangements including deletion, circularization or DNA amplification depending on DSB repair by homologous or illegitimate recombination. The endonuclease NucS, which is

**suspected to participate to the post-replicative correction of mismatches (MMR), could be a physiological source of DSBs and drive genome plasticity.**

*Streptomyces* are soil bacteria whose genome, a large linear chromosome (6-12 Mb in size), is prone to large DNA rearrangements, possibly involved in adaptation to changing conditions within the ecological niche. These bacteria possess at least two repair pathways to cope with DSBs: homologous recombination and illegitimate recombination known as NHEJ for Non homologous End Joining (Hoff *et al.* 2017, Hoff *et al.* 2018). Recently, we have characterized the actors and their role in chromosome rearrangements (Hoff *et al.* 2016; Hoff *et al.* 2017; Hoff *et al.* 2018).

Previous results led us to create genetic backgrounds defective for these DNA repair pathways in our working model *Streptomyces ambofaciens*. The high frequency of rearrangements observed in *Streptomyces* could be associated with the formation of DSBs along the chromosome. Recent studies in archaea revealed that an endonuclease called NucS or EndoMS is involved in mismatch repair and would achieve its role by cleaving DNA on both strands at the mismatch point (Ishino *et al.* 2016 ; Nakae *et al.* 2016 ; Ren *et al.* 2009). The gene encoding NucS is conserved through all the species and strains of *Streptomyces* suggesting an essential role for NucS in these bacteria.

The aim of this project is to generate two types of mutants of *nucS* in *Streptomyces ambofaciens*: deficient for NucS (deletion or null mutants) and overexpressing NucS. These mutants will help to understand the putative role of NucS in genome plasticity.

- First we will survey mutagenesis rates (rifampicine resistance) of *nucS* mutants relative to the wild-type strain. This will help to confirm the role of NucS in DNA repair in *Streptomyces*, and notably in MMR.
- Second, we will search for DNA rearrangements (frequency, nature) in strains expressing NucS at different levels and in different genetic backgrounds relative to recombination (homologous and NHEJ pathways). This will question the involvement of NucS in the formation of chromosomal DSBs.

Key words: *Streptomyces*, DSBs, *nucS*, deletion, overexpression, mutator