HAL
open science

Etude du système de résolution des dimères de chromosome chez Vibrio cholerae - Implication dans le contrôle de la lysogénie du phage CTXϕ codant pour la toxine cholérique

Marie-Eve Val

To cite this version:

Marie-Eve Val. Etude du système de résolution des dimères de chromosome chez Vibrio cholerae - Implication dans le contrôle de la lysogénie du phage CTXϕ codant pour la toxine cholérique. Biochimie, Biologie Moléculaire. Paris-Sud XI, 2008. Français. NNT : . tel-01285537

HAL Id: tel-01285537

https://inserm.hal.science/tel-01285537

Submitted on 9 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS-SUD XI

ECOLE DOCTORALE GENES – GENOMES – CELLULES

THESE

présentée par

Marie-Eve Val

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Etude du système de résolution des dimères de chromosome chez *Vibrio cholerae*

Implication dans le contrôle de la lysogénie du phage CTXφ codant pour la toxine cholérique

Soutenue le 27 Juin 2008

Thèse dirigée par Dr. François-Xavier BARRE

JURY

Pr. Patrick FORTERRE	Président du Jury
Pr. Bernard HALLET	Rapporteur
Dr. Dave LANE	Rapporteur
Dr. Didier MAZEL	Examinateur
Dr. Bénédicte MICHEL	Examinateur
Dr. François-Xavier BARRE	Directeur de thèse

RESUME

La plupart des bactéries ont un unique chromosome circulaire. Lors de la réplication, des dimères de chromosome peuvent se former par crossover entre chromatides sœurs. La dimérisation des chromosomes empêche la ségrégation de l'information génétique entre les deux cellules filles. Pour empêcher cela, les recombinases à tyrosine, XerC et XerD, résolvent les dimères de chromosomes en ajoutant un crossover au niveau d'un site spécifique du chromosome, appelé *dif*. Chez *Escherichia coli*, la résolution des dimères de chromosomes est coordonnée à la division cellulaire par une protéine septale, FtsK. FtsK pompe l'ADN chromosomique du dimère au travers du septum de division jusqu'à mise en contact des deux sites *dif* que le dimère porte, puis FtsK active la recombinaison XerC/D pour résoudre le dimère en deux chromosomes monomériques ségrégeables.

Vibrio cholerae possède deux chromosomes circulaires portant chacun un site *dif* différent, *dif*1 pour le chromosome I et *dif*2 pour le chromosome II. Le système de résolution des dimères de chromosomes doit donc faire face dans cet organisme à un degré de complexité plus élevé pour assurer la ségrégation de deux chromosomes. D'autre part, *V. cholerae* est l'agent responsable du cholera. La toxine cholérique, qui provoque les diarrhées mortelles du choléra, est codée par le phage tempéré CTXφ. CTXφ s'intègre dans le génome de son hôte au niveau du site *dif*, en détournant l'action des deux recombinases XerC et XerD de leur fonction de maintenance. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'étude du système de résolution des dimères de chromosomes chez *V. cholerae* à la fois pour comprendre son rôle dans le cycle cellulaire normale de cette bactérie "bi-chromosomique", mais aussi pour comprendre sa contribution à l'intégration du phage CTXφ et donc à l'émergence de nouveaux variants pathogènes.

Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir comment le phage CTXφ détourne les recombinases XerC/D pour s'intégrer dans le génome de son hôte. Nos travaux montrent que le génome simple brin du phage possède une région capable de former une structure secondaire reconstituant un site *dif*, qui est pris en charge par les recombinases XerC/D pour être recombinée avec le site *dif* bactérien. A travers cette étude, nous avons découvert un nouveau mode de transfert horizontal d'ADN.

Dans un second temps, nous avons montré que la résolution des dimères des deux chromosomes de *V. cholerae* suit une même voie recombinationnelle, qui est contrôlée par la protéine septale FtsK. Ceci est le premier exemple d'un système commun de maintenance de multiples chromosomes chez les bactéries. Cela suggère aussi une synchronisation de la résolution des dimères des deux chromosomes au cycle cellulaire de la bactérie.

Enfin, chez *E. coli*, le rôle de translocation de FtsK dans la ségrégation des chromosomes est apparemment limité au seul besoin de contrôler la résolution des dimères de chromosomes. Au contraire, mes travaux montrent un rôle plus général de la fonction de translocation de FtsK dans la ségrégation des chromosomes chez *V. cholerae*.

Study of the system of chromosome dimers resolution in *Vibrio cholerae*.

Implication in the control of the lysogeny of the phage CTXφ coding for choleric toxin

The majority of the bacteria have a single circular chromosome. At the time of replication, chromosome dimers can be formed by homologous recombination between sister chromatides. Dimerisation of replicating chromosomes prevents the faithful segregation of genetic information between the two daughter cells. To correct this, the tyrosine recombinases, XerC and XerD, resolve dimers by adding an additional crossover at a specific site on the chromosome called *dif*. In *Escherichia coli*, the resolution of chromosome dimers is coordinated with cellular division by a septal protein, FtsK. FtsK pumps the DNA of dimers through the division septum until encountering *dif,* thereby aligning the two sites that the dimer carries. FtsK then activates XerC/D recombination to resolve the dimer into two monomeric chromosomes that can be segregated prior to division.

Vibrio cholerae has two circular chromosomes, each one carrying a unique *dif* site, *dif1* for chromosome I and *dif2* for chromosome II. The system of resolution of chromosome dimers must therefore manage a higher degree of complexity to ensure the segregation of two chromosomes. Of additional interest, *V. cholerae* is the agent responsible for the cholera. The choleric toxin, which causes the potentially deadly diarrheas of cholera, is coded by the temperate phage CTXφ. CTXφ is integrated into the genome of its host *dif* site by hijacking the activity of XerC and XerD. During my thesis, I was interested in the study of the system of resolution of chromosome dimers in *V. cholerae.* My goal was to not only understand its role in the normal cellular cycle of this multi-chromosomal bacterium, but also to take account of its contribution to the integration of the phage CTXφ.

Initially, we sought to understand how the phage CTXφ diverts the recombinases XerC/D to integrate itself in the genome of its host. Our work showed that the single-stranded genome of the phage contains a locus that is able to form a secondary structure which reconstitutes a viable *dif* site. This site is acted upon by the recombinases XerC/D, recombining it with the bacterial *dif* site. Through this study, we discovered a novel mode of horizontal transfer of DNA.

Secondly, we showed that the resolution of dimers of the two chromosomes of *V. cholerae* follows the same catalytic pathway, which is controlled by the septal protein FtsK. This is the first example of a common system of maintenance of multiple chromosomes in bacteria. Our results also suggest a synchronization of chromosome dimer resolution in the two replicons and the cellular cycle of the bacterium.

Lastly, in *E. coli*, the role of DNA translocation by FtsK in the segregation of the chromosomes is apparently limited only to the requirement to control the resolution of chromosomes dimers. In *V. cholerae*, on the contrary, my work shows a more general role of the function of translocation of FtsK in the segregation of the chromosomes.

.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Bernard Hallet et Dave Lane pour avoir accepté la lourde tâche d'être mes rapporteurs de thèse.

Je remercie tous les membres de mon jury de thèse, Bénédicte Michel, Patrick Forterre, Didier Mazel, Bernard Hallet et Dave Lane pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail, pour leurs remarques pertinentes lors de ma soutenance et pour leurs messages d'encouragement.

Je remercie FX Barre pour m'avoir accueillie dans son équipe, pour le savoir qu'il m'a transmis et pour la confiance qu'il m'a témoignée. Il m'a donné l'indépendance dont j'avais besoin pour m'épanouir, tout en se montrant disponible pour les questions inopinées de fin de journée. Il lui a parfois été difficile de ne pas demander mes résultats de manips avant que je vienne le voir pour en parler et je le remercie de cet effort…

Je voudrais remercier les personnes qui ont contribué de près ou de loin à mes travaux de thèse : Marie Bouvier et Didier Mazel de l'Institut Pasteur ; Javier Campos et Rafael Fando du CNIC ; Meriem El Karoui de l'INRA ; François Cornet du LMGM/CNRS ; Vik Sivanathan et David Sherratt de l'Université d'Oxford.

Un grand merci à Marie Bouvier et Didier Mazel pour m'avoir formé et fournit les outils nécessaires à mon travail chez Vibrio.

Merci à Bénédicte Michel de m'apporter sa grande expertise sur la recombinaison lorsque je suis dans l'impasse.

Je remercie la petite troupe du « Barre Land » pour leur grande convivialité : Laetitia Bonné, Fabien Chevalier, Nelly Dubarry, Sean Kennedy et Christophe Possoz.

Je remercie les membres du « Boccard Lab ». Merci à Olivier Espeli pour m'avoir transmis sa passion pour la microbiologie lorsqu'il était en thèse et que j'étais son étudiante de BTS. Je remercie Frédéric Boccard pour m'avoir soutenue activement lors de ma recherche de stage, de thèse et d'emploi, son implication a eu un sérieux impact sur ma carrière. Je remercie Emilie Esnault et Michèle Valens pour toutes leurs astuces techniques de microscopie et de bio mol.

Je remercie les « levuristes » du couloir pour avoir partagé le café avec les microbiologistes du coin donnant lieu à des discussions fort sympathiques. Merci plus particulièrement à Emilie Esnault, Myriam Bourens, Cécile Nouet et Lise Matthieu pour les débriefings de fin de semaine…

Je remercie Tracy Belande, Anita Prévot et Marilyne Thiébaut pour leur aide technique et pour avoir allégé notre charge de travail au laboratoire.

Je tiens à remercier ma famille et mes copines de longue date, Christelle et Sandrine, pour leurs encouragements.

Et pour finir, je tiens à remercier mon mari pour sa présence, son soutien moral et qui m'a donné la confiance nécessaire pour entreprendre un travail de thèse.

AVANT-PROPOS 17

INTRODUCTION 19

I. LA RECOMBINAISON SPECIFIQUE DE SITE CATALYSEE PAR LES RECOMBINASES A TYROSINE 21

I.1. LA RECOMBINAISON SPECIFIQUE DE SITE 21
I.1.1. Mécanisme général de la recombinaison spécifique de site 21
I.1.2. Les évènements de recombinaison spécifique de site 22
I.1.2.1. Evènement de recombinaison inter-moléculaire 22
I.1.2.1.1. Intégration 22
I.1.2.1.2. Recombinaison entre deux molécules linéaires 23
I.1.2.2. Evènement de recombinaison intra-moléculaire 23
I.1.2.2.1. Excision / Résolution 23
I.1.2.2.2. Inversion 24
I.1.3. Deux catégories de recombinases spécifiques de site 25
I.2. LES RECOMBINASES A TYROSINE 27
I.2.1. Organisation structurale des recombinases à tyrosine 28
I.2.2. Les résidus catalytiques du site actif 30
I.2.3. La fixation des recombinases à l'ADN 31
I.2.3.1. Structure d'un site de recombinaison spécifique 31
I.2.3.2. La fixation des recombinases au site core 32
I.2.3.3. La fixation des recombinases aux séquences accessoires 33
I.2.4. Structure du complexe synaptique 34
I.2.5. Activation séquentielle des recombinases à tyrosine 35
I.2.6. Mécanisme séquentiel d'échange des brins 36
I.2.7. Contrôle de la recombinaison 39
I.2.7.1. Sélectivité de brin 39
I.2.7.2. Contrôle directionnel 40

II. LA RECOMBINAISON XER 43

II.1. LES RECOMBINASES XERC ET XERD 43
II.1.1. Généralités sur les recombinases XerC et XerD 43
II.1.2. Le Modèle des recombinases XerC/D 44
II.1.3. Mécanisme catalytique des recombinases XerC et XerD 46
II.2. LES FONCTIONS DE LA RECOMBINAISON XER 47
II.2.1. Résolution des multimères de plasmides 48
II.2.1.1. Origines des multimères de plasmides 48
II.2.1.2. Cas des plasmides ColE1 et pSC101 50
II.2.2. Résolution des dimères de chromosomes 53
II.2.2.1. Les dimères de chromosomes 53
II.2.2.2. Le contrôle de la recombinaison à dif par FtsK 59
II.2.3. Décaténation des chromosomes 66
II.2.4. Acquisition horizontale de gènes à dif 69
II.3. LE SYSTEME XER, UN SYSTEME TRES REGULE 70

III. *VIBRIO CHOLERAE* : UN NOUVEAU MODELE POUR L'ETUDE DU SYSTEME DE RESOLUTION DES DIMERES 74

III.1. *VIBRIO CHOLERAE*, L'AGENT PATHOGENE DU CHOLERA 74
III.1.1. Le choléra 74
III.1.2. L'acquisition horizontale des gènes de virulence 75
III.1.3. Le phage CTXφ 76
III.2. *VIBRIO CHOLERAE*, UNE BACTERIE A DEUX CHROMOSOMES 80
III.2.1. Structure et évolution du génome des Vibrionaceae 80

III.2.2. Quels avantages à conserver deux chromosomes ? ... *83*
III.2.3. Le petit chromosome : domestication d'un mégaplasmide ? ... *84*
III.2.3.1. Des systèmes partagés et distincts gouvernent la réplication des deux chromosomes ... 85
III.2.3.2. Deux systèmes distincts gouvernent la partition des origines des deux chromosomes ... 88
III.2.3.3. Ségrégation du terminus de réplication des deux chromosomes ... 90
III.2.3.4. Un système commun de résolution des dimères des deux chromosomes ... 90

RESULTATS ... **93**

I. RÉSULTATS PUBLIÉS : THE SINGLE-STRANDED GENOME OF PHAGE CTX IS THE FORM USED FOR INTEGRATION INTO THE GENOME OF *VIBRIO CHOLERAE* ... **95**

I.1. DONNEES QUI ONT CONDUIT A L'HYPOTHESE D'UNE INTEGRATION SIMPLE BRIN DE CTXΦ ... 95
I.2. PREUVES EXPERIMENTALES DE L'INTEGRATION SIMPLE BRIN DE CTXΦ ... 100
I.3. CONCLUSION ... 101
ARTICLE : THE SINGLE-STRANDED GENOME OF PHAGE CTX IS THE FORM USED FOR INTEGRATION INTO THE GENOME OF VIBRIO CHOLERAE ... 105

II. RESULTATS SOUMIS POUR PUBLICATION : FTSK-DEPENDENT DIMER RESOLUTION ON MULTIPLE CHROMOSOMES IN THE PATHOGEN *VIBRIO CHOLERAE* ... **115**

II.1. LA RESOLUTION DES DIMERES DE CHROMOSOMES CHEZ *V. CHOLERAE* ... 116
II.2. LE MODE DE CLIVAGE DES RECOMBINASES XERC/D DE *V. CHOLERAE* EST CONFORME AU PARADIGME D'*E. COLI* ... 118
II.3. UN MECANISME COMMUN DE RESOLUTION DES DIMERES ... 118
II.4. CO-EVOLUTION DU SYSTEME XERC/D, *DIF*1/*DIF*2 ET FTSK DE *V. CHOLERAE* POUR GARDER UN SYSTEME CONTROLE DE LA RESOLUTION DES DIMERES DE CHROMOSOMES. ... 118
II.5. LA PRESENCE DE DEUX SITES DIFFERENTS DE RESOLUTION DE DIMERES PERMET D'EMPECHER LES EVENEMENTS DE RECOMBINAISON ENTRE CHROMOSOMES NON-HOMOLOGUE. ... 119
II.6. FTSK^{Vc} RECONNAIT DES SEQUENCES POLAIRES KOPS POUR TRANSLOQUER L'ADN DE MANIERE ORIENTEE ... 120
II.7. NATURE DU PETIT CHROMOSOME A TRAVERS SON SYSTEME DE RESOLUTION DES DIMERES ... 121
ARTICLE SOUMIS POUR PUBLICATION : **FTSK-DEPENDENT DIMER RESOLUTION ON MULTIPLE CHROMOSOMES IN THE PATHOGEN *VIBRIO CHOLERAE*** ... 123

III. RESULTATS NON PUBLIES : FTSK$_C$ POSSEDE UNE NOUVELLE FONCTION DANS LA SEGREGATION DES CHROMOSOMES CHEZ *V. CHOLERAE* ... **167**

INTRODUCTION ... **167**

RESULTATS ... **175**

DEFINITION DU DOMAINE C-TERMINAL DE FTSK, FTSKC ... 175
EVIDENCES POUR UNE FONCTION ADDITIONNELLE DE FTSKC CHEZ *V. CHOLERAE*, EN DEHORS DE LA RESOLUTION DES DIMERES DE CHROMOSOMES. ... 177
LES DOMAINES A, B DE FTSK ET L'HYDROLYSE DE L'ATP SONT INDISPENSABLES POUR LA NOUVELLE FONCTION DE FTSKC ... 181
L'INACTIVATION DE LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE CATALYSEE PAR RECA RETABLIT TOTALEMENT LA VIABILITE DES MUTANTS *FTS*KC- ... 187
FTSK TRANSLOQUE SUR DES CHROMOSOMES MONOMERIQUES CHEZ *V. CHOLERAE* ... 191
CO-LOCALISATION DE LA REGION *DIF* DES DEUX CHROMOSOMES AU SEPTUM INDEPENDAMMENT DE LA FORMATION DE DIMERES DE CHROMOSOMES. ... 195

DISCUSSION ... **196**

FTSK A UN ROLE GENERAL DANS LA SEGREGATION DES CHROMOSOMES DE *V. CHOLERAE* ... 196
LA FONCTION DE TRANSLOCATION DE FTSK EST IMPORTANTE DANS LA SEGREGATION DES CHROMOSOMES ... 197

LA LECTURE POLARISEE DU CHROMOSOME N'EST PAS NECESSAIRE POUR ASSURER LA NOUVELLE FONCTION DE FTSK DANS LA SEGREGATION DES CHROMOSOMES 198
FTSK PEUT TRANSLOQUER SUR DES CHROMOSOMES MONOMERIQUES 199
FTSKC NE SEMBLE PAS ESSENTIELLE DANS LA FONCTION DE SEPARATION DES CATENATS REPLICATIFS 200
L'ACTIVITE DE TRANSLOCATION DE FTSK EST LIEE A L'ACTIVITE DE RECOMBINAISON HOMOLOGUE DE RECA 201

MATERIEL ET METHODES 203

SOUCHES ET PLASMIDES UTILISES 203
CONJUGAISONS ET REMPLACEMENTS ALLELIQUES DANS *V. CHOLERAE* 206
MICROSCOPIE 206
ESSAI DE COMPETITION DE CROISSANCE 209
MESURE DU TAUX DE RECOMBINAISON XER SUR CHROMOSOME 210

DISCUSSION 213

I. MODE D'ACTION DES RECOMBINASES XERC/D EN FONCTION DU SUBSTRAT DE RECOMBINAISON 215

I.1. LES FONDEMENTS COMMUNS DE LA RECOMBINAISON XER A *DIF*1, *DIF*2 ET CTX-*ATT*P 216
I.2. INFLUENCE DE LA REGION CENTRALE DANS LE MECANISME DE RECOMBINAISON 216
I.2.1. La séquence de la région centrale 216
I.2.2. Cas particulier de CTX-attP : une région centrale non appariée 218
I.2.3. La taille de la région centrale 219
I.2.4. L'homologie de séquence de la région centrale entre les deux sites partenaires 220
I.3. LES SITES DE FIXATION DES RECOMBINASES XERC/D 221
I.4. LA NECESSITE D'AUTRES FACTEURS 222

II. UN NOUVEAU MODE D'INTEGRATION PHAGIQUE 223

III. UN SYSTEME COMMUN DE MAINTENANCE D'UN GENOME MULTIPARTITE 226

IV. ROLE DE FTSKC DANS LA SEGREGATION DES DEUX CHROMOSOMES DE *V. CHOLERAE* 227

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 231

Liste des figures

Figure 1. Possibles évènements de la recombinaison spécifique de site 22
Figure 2. Mécanisme de recombinaison des recombinases spécifique de site 26
Figure 3. Structure de Cre. 29
Figure 4. Comparaison de l'organisation structurale des recombinases à tyrosine. 30
Figure 5. Représentation schématique du site actif des recombinases à tyrosine. 31
Figure 6. Organisation des sites de recombinaison des recombinases à tyrosine. 32
Figure 7. Structure d'un protomère de Cre sur son site de recombinaison. 33
Figure 8. Comparaison de la fixation de Intλ par rapport à des recombinases plus simples. 33
Figure 9. Modèle du complexe synaptique Cre/loxP 34
Figure 10. Clivage en cis ou en trans par la tyrosine catalytique 35
Figure 11. Modèle d'activation séquentielle et d'inhibition réciproque des recombinases 36
Figure 12. Mécanisme de coupure et de ligation des recombinases à tyrosine 37
Figure 13. Mécanisme séquentiel d'échange de brins 38
Figure 14. Modèle de sélectivité de brin 40
Figure 15. Contrôle directionnel de la recombinaison par l'asymétrie de la région centrale 41
Figure 16. Cladogramme Radial des proteines XerC et XerD 45
Figure 17. Voies possibles de résolution de la jonction de Holliday par Xer. 47
Figure 18. Voies de formation de dimères par réplication ou par recombinaison homologue 49
Figure 19. La multimérisation des plasmides provoque une instabilité de ségrégation 50
Figure 20. Formation d'une synapse à *psi* dans un dimère de plasmide pSC101 51
Figure 21. Voies catalytiques de recombinaison des recombinases XerC/D aux sites *cer* et *psi* 52
Figure 22. Conséquences de crossovers entre chromosomes linéaires ou circulaires 53
Figure 23. Résolution de la jonction de Holliday par RuvABC. 54
Figure 24. Résolution des problèmes amenés par crossover entre chromosome circulaire 55
Figure 25. Formation de filaments jumeaux ('Twin filaments') 57
Figure 26. Modèle d'activation de $FtsK_C$ lors de la fermeture du septum de division 61
Figure 27. Organisation de la protéine FtsK 62
Figure 28. Voie de recombinaison Xer à *dif* dépendante et indépendante de FtsK 63
Figure 29. Double fonction de la protéine FtsK dans la résolution des dimères de chromosomes. 65
Figure 30. Contrôle directionnel, structural et temporel de la CDR 66
Figure 31. Modèle de formation des précaténats 67
Figure 32. Modèle de ségrégation de la région du terminus de réplication durant la CDR 68
Figure 33. Intégration de la ségrégation des chromosomes et de la division cellulaire par FtsK 69
Figure 34. Les étapes clefs du cycle de vie du phage CTXφ 77
Figure 35. Organisation génétique des phages filamenteux RS1 et CTXφ 78
Figure 36. Comparaison de l'organisation des prophages CTX et RS1 dans divers variants. 79
Figure 37. Modèle de production extra-chromosomique d'ADN CTXφ 80
Figure 38. Relations des grands et petits chromosomes 82
Figure 39. Besoin communs et distinct pour la réplication des deux chromosomes 86
Figure 40. Initiation ou terminaison synchrone de la réplication des deux chromosomes 88
Figure 41. Modèle de la dynamique de ségrégation des origines des deux chromosomes 89
Figure 42. Représentation schématique de la ségrégation de l'origine des deux chromosomes. 90
Figure 43. Organisation génétique des prophages CTX et RS1 de la souche O1-El Tor N16961 94
Figure 44. Représentation schématique de génome de CTXφ 94
Figure 45. Représentation des sites I et II du site *att*P double brin de CTXφ. 94
Figure 46. Séquence des sites *dif*1 (*att*B), *dif*2, et des sites I et II de *att*P. 96
Figure 47. Modèle d'intégration double brin de CTXφ 96
Figure 48. Site simple brin d'intégration de CTXφ en structure d'épingle à cheveux 98
Figure 49. Prédictions de structures secondaires formées par le génome simple brin de CTXφ 98
Figure 50. Système de conjugaison utilisant un vecteur suicide contenant le site *att*P. 98
Figure 51. Avantage topologique des génomes multipartite 117
Figure 52. Représentation des protéines FtsK d'*E. coli* et de *V. cholerae* 174
Figure 53. Problème dramatique de ségrégation du nucléoïde du mutant *fts*Kc-. 176
Figure 54. Le défaut de croissance du mutant *fts*Kc- est plus important que celui du mutant *xer*C... 178
Figure 55. Taux de mortalité du mutant *fts*Kc- 178
Figure 56. Taux de cellules non viables du mutant *fts*Kc- 180

Figure 57. Analyse du profil de filamentation des mutants *xer*C et *fts*Kc- en microcolonies. 180
Figure 58. L'activité ATPase et le domaine γ de FtsK de *V. cholerae* sont nécessaire à l'activation de la recombinaison Xer..... 182
Figure 59. Complémentation du mutant *fts*Kc- par divers variants de FtsK. 182
Figure 60. Le défaut de ségrégation du mutant *fts*Kc- est atténué par l'expression de FtsKγ-. 184
Figure 61. L'hydrolyse de l'ATP est indispensable pour assurer la fonction inconnue de FtsKc mais pas le domaine γ 184
Figure 62. Le domaine γ de FtsK a un rôle limité à la résolution des dimères de chromosomes. 186
Figure 63. L'induction de la réponse SOS est plus forte dans un mutant *fts*Kc-..... 186
Figure 64. L'inactivation de RecA supprime le phénotype filamenteux du mutant *fts*Kc-..... 188
Figure 65. L'inactivation de RecA supprime l'effet délétère de la mutation *fts*Kc-. 188
Figure 66. Représentation schématique de l'essai de recombinaison à *dif* sur chromosome. 190
Figure 67. FtsK active la recombinaison Xer indépendamment de la formation de dimères 192
Figure 68. La recombinaison Xer entre le grand et le petit chromosome est indépendante de la formation des dimères de chromosome. 194
Figure 69. Condensation des nucléoïdes de *V. cholerae* au chloramphénicol. 208
Figure 70. Séquences des trois sites de recombinaison de recombinaison XerC/D de V. cholerae.. 218
Figure 71 . Modèle de résolution de la jonction de Holliday formée entre les sites *att*C simple brin et *att*I double brin 225

Liste des tableaux

Tableau 1. Séquence des sites de recombinaison Xer 70
Tableau 2. Description des génomes des six membres séquencés de la famille des Vibrionaceae. . 81

Liste des abréviations

% : pourcent
º : degré
ºC : degré Celsius
Å : angstrom
aa : acide aminé
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
att : site d'attachement
*att*B : site d'intégration bactérien
*att*C : site d'intégration de cassette de gène
*att*I : site d'intégration de la plateforme des intégrons
*att*L : site gauche de la jonction entre prophage - chromosome bactérien
*att*P : site d'intégration du phage
*att*R : site droit de la jonction entre prophage - chromosome bactérien
CDR : Chromosome Dimer Resolution
C-ter : Carboxy-terminal
CTX-*att*P : site d'intégration du phage CTX
DAZ : dif activity zone
db : double brin
exp : exponentiel
f_{dimer} : fréquence de formation de dimères de chromosome par cellule par génération
FtsKc : domaine C-terminal de FtsK
FtsKγ : sous-domaine gamma de FtsKc
$FtsK_{ATP-}$: FtsK dépourvue de l'activité d'hydrolyse de l'ATP
HJ : Holliday junction
Ig : région intergénique
Int : Intégrase
Kb : kilobase
KOPS : FtsK Orienting Polar Sequences
Log : logarithme
Ln : logarithme népérien
Mb : Mégabase
min. : minute
nt : nucléotide
N-ter : Amino-terminal
OH : groupe hydroxyle
ori (+) : origine de réplication simple brin par cercle roulant
P : groupe phosphate
pb : paire de base (bp)
pCTX : forme réplicative du phage CTXφ
R^2 : coefficient de corrélation
RC : région centrale
sb : simple brin
SI : superintegron
Tn : transposon
ts : thermo-sensible

AVANT-PROPOS

Omniprésence des systèmes de recombinaison dans le maintien et la diversité des génomes

L'information génétique, encryptée sous forme d'ADN, code pour l'ensemble des caractères d'un organisme. Il est donc primordial d'en préserver l'intégrité au fil des générations. Pour cela, l'ADN est copié à l'identique au cours de la réplication pour être transmis verticalement aux générations suivantes. Des systèmes de maintenance permettent de s'assurer du bon déroulement de la réplication et de la répartition de l'ADN dans chacune des cellules filles. Parmi ces systèmes de maintenance, la recombinaison, qui constitue l'échange d'information génétique entre deux séquences d'acides nucléiques, tient une place très importante car elle intervient à la fois dans les processus de réplication, de réparation et de ségrégation de l'ADN.

Il est aussi important que de nouvelles combinaisons génétiques apparaissent afin d'assurer la diversité d'une population et ainsi faciliter son adaptation aux changements environnementaux. La diversité génétique est favorisée par des phénomènes de mutations mais aussi par des remaniements plus grands : chez les organismes supérieurs, la reproduction sexuée permet le brassage des gènes par recombinaison entre les chromosomes homologues parentaux au cours de la méïose. Chez les bactéries, la diversité génétique est favorisée par transmission horizontale d'un ADN étranger, qui peut s'intégrer par recombinaison dans le génome de la bactérie hôte. Ainsi, la recombinaison est omniprésente dans la plupart des processus évolutifs.

Les trois mécanismes de recombinaison les plus importants sont : (1) La recombinaison homologue, (2) la recombinaison transpositionnelle et (3) la recombinaison spécifique de site. Ces trois voies se distinguent par les mécanismes mis en œuvre, les protéines impliquées et la nature des cibles recombinées.

(1) La recombinaison homologue est un échange de matériel génétique entre deux segments d'ADN qui partagent une longue séquence d'homologie (> 30 pb).

(2) La recombinaison transpositionnelle ou transposition est le mécanisme capable de générer le plus de diversité. Il n'y a en effet aucune similitude de séquence entre les sites échangés, de plus la spécificité de cible est faible. Les réarrangements provoqués auront donc un très fort caractère aléatoire.

(3) La recombinaison spécifique de site a lieu au niveau de sites spécifiques. A l'inverse de la transposition, sa spécificité de cibles est très haute et elle nécessite également de courtes séquences d'homologie entre les sites échangés. A l'inverse de la recombinaison homologue et de la transposition, la recombinaison spécifique de site est dite conservative car elle n'engendre ni synthèse ni dégradation des fragments d'ADN impliqués.

INTRODUCTION

I. LA RECOMBINAISON SPECIFIQUE DE SITE CATALYSEE PAR LES RECOMBINASES A TYROSINE

La recombinaison spécifique de site est retrouvée de manière ubiquitaire dans tous les organismes. Elle peut jouer un rôle dans la maintenance de l'intégrité des génomes, mais aussi servir de source de variabilité génétique en favorisant des remaniements génétiques internes ou en favorisant la transmission horizontale de nouvelles informations génétiques.

I.1. La recombinaison spécifique de site

I.1.1. Mécanisme général de la recombinaison spécifique de site

La recombinaison spécifique de site a lieu au sein d'un complexe nucléoprotéique engageant deux paires de recombinases et deux sites d'ADN double brin. La spécificité de la recombinaison est liée à une forte spécificité de fixation des recombinases pour leur site ADN cible. Deux protomères de recombinases fixent un site ADN et s'apparient avec deux autres recombinases d'un complexe nucléoprotéique similaire pour former un complexe tétramérique actif. Cet assemblage est appelé complexe synaptique ou synapse de recombinaison. Dans la synapse, les recombinases font des coupures simple brin d'ADN à des positions spécifiques et identiques sur les deux sites, et rejoignent les fragments d'ADN après échanges de brin entre les deux sites partenaires. Au final, il y aura eu quatre coupures et quatre échanges de brins d'ADN. De très courtes séquences d'homologie au niveau du site de coupure et de ligation sont généralement indispensables à l'échange de brin (Nunes-Duby *et al.*, 1995). Aucun cofacteur énergétique n'est nécessaire, l'énergie est conservée par la formation d'une liaison

covalente recombinase-ADN et réutilisée pour rejoindre les molécules d'ADN (Sadowski, 1986).

I.1.2. Les évènements de recombinaison spécifique de site

On distingue plusieurs types d'évènements (Figure 1) :

- selon si la réaction est intra- ou inter-moléculaire
- en fonction de la forme linéaire ou circulaire des molécules participantes
- en fonction de la position ou de l'orientation relative des sites de recombinaisons.

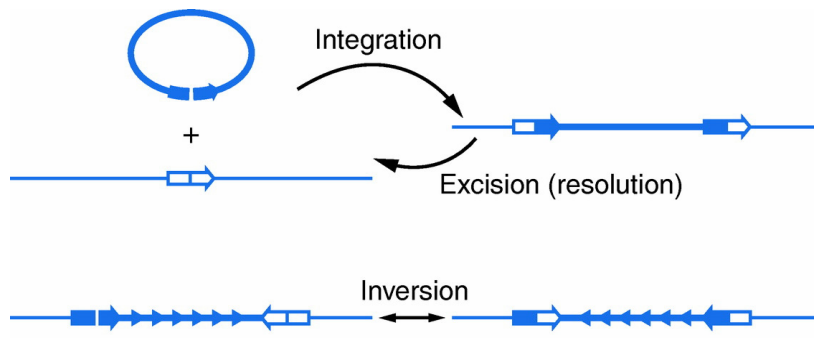


Figure 1. Possibles évènements de la recombinaison spécifique de site (Grindley *et al.*, 2006)

I.1.2.1. Evènement de recombinaison inter-moléculaire

I.1.2.1.1. Intégration

L'intégration est un évènement de recombinaison entre deux sites portés par deux molécules différentes dont au moins une des deux molécules participantes est circulaire. Si les deux molécules sont circulaires, il y aura formation d'une molécule hybride circulaire. Si l'une des molécules est linéaire et l'autre circulaire, il y aura production d'une molécule hybride linéaire. Parmi les recombinases spécifiques de site qui catalysent l'intégration, on retrouve la recombinase IntΛ qui catalyse l'intégration/excision du phage Lambda, les recombinases IntI qui catalysent

l'intégration/excision de cassette de gènes dans les intégrons et les intégrases Int qui catalysent l'intégration/excision des transposons conjugatifs (Tn916, Tn1545, SXT...). Dans certains cas, les recombinases de l'hôte sont détournées de leur fonction cellulaire pour catalyser l'intégration d'éléments exogènes. Par exemple, les recombinases XerC et XerD normalement impliquées dans des évènements de résolution (voir partie I.1.2.2.1) peuvent catalyser l'intégration du phage filamenteux CTXφ dans le génome de *V. cholerae* (Huber & Waldor, 2002).

I.1.2.1.2. Recombinaison entre deux molécules linéaires

La recombinaison spécifique de site entre deux molécules linéaires dont un des sites de recombinaison est interne conduit à la formation de deux molécules linéaires hybrides. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les chromosomes linéaires de *Borrelia burgdorferi* peuvent être fusionnés par la résolvase ResT, une protéine apparentée aux recombinases spécifiques de site (Kobryn & Chaconas, 2005).

I.1.2.2. Evènement de recombinaison intra-moléculaire

I.1.2.2.1. Excision / Résolution

L'excision et la résolution sont des évènements de recombinaison qui se passent entre deux sites placés en répétition directe et portés par une même molécule. Ces deux réactions sont relativement similaires dans le mécanisme mis en œuvre même s'ils représentent des événements biologiques différents. Les deux produits après recombinaison sont soit identiques dans le cas de la résolution de dimères de réplicons, soit différents dans le cas de l'excision de phages, transposons conjugatifs, cassette d'intégrons ou co-intégrat. Les recombinases les plus étudiées catalysant la résolution de réplicons sont les recombinases Cre (du phage P1) et

XerC/D (de la plupart des bactéries à chromosome circulaire). Les recombinases qui catalysent l'excision sont généralement les mêmes qui catalysent l'intégration (voir chapitre I.1.2.1), mise à part quelques exceptions où la recombinase va catalyser uniquement l'excision. C'est le cas des transposons de la famille Tn3, comme par exemple Tn4430 et γδ qui s'intègrent par transposition mais dont l'étape d'excision est de la recombinaison spécifique de site catalysée par les recombinases TnpI et TnpR respectivement (Grindley et al., 2006).

I.1.2.2.2. Inversion

L'inversion nécessite que les deux sites de recombinaison soient portés par la même molécule mais dans ce cas, les sites sont en répétition inversée. Leur assemblage dans la synapse va conduire à l'inversion du matériel génétique situé entre les deux sites plutôt qu'à leur délétion. L'exemple d'inversion le plus connu est le contrôle de la réplication du plasmide 2 µm de Saccharomyces cerevisiae qui est assuré grâce à un évènement d'inversion entre deux sites *FRT* (Volkert et al., 1986). Le plasmide 2 µm possède une origine de réplication de type chromosomique et de ce fait, sa réplication n'est initiée qu'une fois par cycle cellulaire. Or ce plasmide, est présent à plus de cent copies par cellule. L'amplification du nombre de copies du plasmide est contrôlée par une recombinase spécifique de site, Flp. Un événement de recombinaison intervenant après passage d'une des fourches de réplication rend la propagation des fourches monodirectionnelle et permet l'amplification du plasmide par un mécanisme de cercle roulant. Un second événement de recombinaison termine l'étape d'amplification et Flp résout les multimères de plasmides. Dans d'autres cas, les évènements d'inversion permettent de faire varier l'expression génique. C'est le cas des recombinases FimB et FimE (Gally *et al.*, 1996) et des

recombinases Hin, Gin et Cin qui catalysent l'inversion d'un fragment d'ADN entrainant des variations de l'expression de gènes (Craig, 1985, van de Putte & Goosen, 1992). Les gènes dont l'expression est contrôlée par ces systèmes codent souvent pour des protéines de surfaces (fibres de la queue de bactériophage, pilline, flagelline), ainsi la recombinaison peut être source de variabilité génétique facilitant l'adaptation des organismes aux changements environnementaux.

I.1.3. Deux catégories de recombinases spécifiques de site

Les recombinases impliquées dans la recombinaison spécifique de site se classent en deux catégories, les recombinases à sérine (résolvases / invertases) et les recombinases à tyrosine (intégrases) nommées ainsi d'après le résidu qui forme un lien covalent avec l'ADN. Ces deux familles présentent quelques caractéristiques communes en termes de catalyse, telles que leur haute spécificité de reconnaissance du site de recombinaison, la formation d'intermédiaires réactionnels covalents avec l'ADN et l'indépendance vis à vis de cofacteurs énergétiques.

Cependant en dépit d'intervenir dans des processus biologiques analogues, les deux classes de recombinases ont évolué pour utiliser des mécanismes d'action très différents. Ces mécanismes varient notamment dans les modes de clivages et d'échanges des brins (Figure 2). Les recombinases à sérine agissent de manière concertée c'est-à-dire qu'elles coupent et échangent quatre brins d'ADN simultanément entre les deux sites partenaires. L'échange de brin entre les sites partenaires est effectué par rotation de 180° d'une moitié du complexe nucléoprotéique par rapport à l'autre.

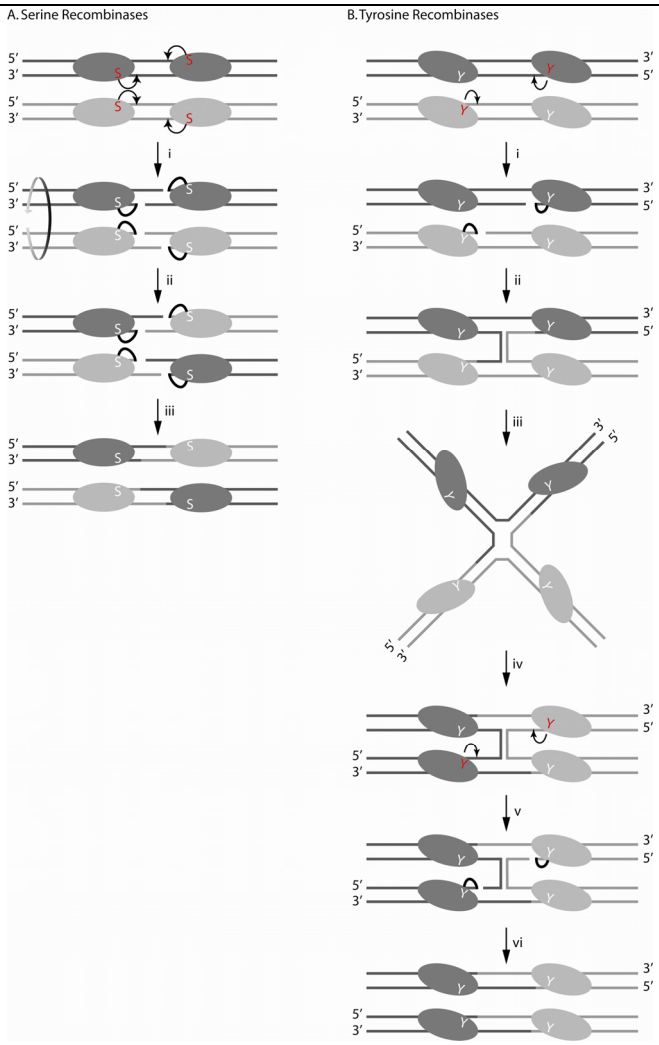


Figure 2. Mécanisme de recombinaison concerté des recombinases à sérine (A) et mécanisme de recombinaison séquentiel des recombinases à tyrosine (B)
(Schéma adapté de (Hallet & Sherratt, 1997))
Les recombinases sont représentées par des ovales avec le résidu catalytique faisant l'attaque nucléophile 'S' ou 'Y'. La différence de couleur entre les recombinases sur les deux sites ADN partenaires n'est donnée qu'à titre informatif pour suivre la réaction, elle n'indique pas une différence entre les recombinases. Les flèches noires représentent l'attaque nucléophile des phosphates scissiles par les groupements hydroxyles des résidus catalytiques (colorés en rouge). Les arcs noirs représentent la liaison covalente entre le résidu catalytique (S ou Y) et le phosphate scissile de l'ADN.
(A) (i) Les 4 brins d'ADN sont clivés de manière concertée par l'attaque nucléophile de la sérine (rouge). La sérine forme un lien covalent 5'-phosphosérine avec l'ADN, libérant des extrémités 3'-OH. (ii) Les brins sont échangés par rotation de 180º d'une moitié du complexe nucléoprotéique et (iii) religués avec le site partenaire.
(B) (i) Une paire de recombinases (rouge) est active et clive deux brins d'ADN. La tyrosine catalytique forme une liaison 3'-phosphotyrosine covalente avec l'ADN libérant des extrémités 5'OH. (ii) Les deux brins clivés sont échangés entre les deux sites partenaires et religués. (iii) Une paire d'échange de brin a été effectuée donnant lieu à un intermédiaire réactionnel appelé jonction de Holliday. (iv) L'isomérisation de la jonction de Holliday permet de positionner l'autre paire de recombinase en configuration active pour (v) couper les deux autres brins d'ADN. (vi) Le deuxième échange de brins permet la résolution de la jonction de Holliday.
Alors que le remodelage du complexe synaptique par les recombinases à sérine nécessite un grand bouleversement de la synapse pour effectuer l'échange des brins, celui des recombinases à tyrosine a lieu avec très peu de changement de la structure quaternaire de la synapse.

A l'inverse des recombinases à sérine, les recombinases à tyrosine agissent de manière séquentielle en coupant seulement un brin de chaque duplex ADN à la fois. Après chaque clivage les brins d'ADN sont échangés avec le site partenaire avant que la seconde étape de clivage puisse démarrer. L'intermédiaire de réaction ayant deux brins d'ADN reliant les deux sites partenaires est appelé une jonction de Holliday. Un remodelage de la jonction de Holliday permet d'activer et d'inactiver réciproquement les paires de recombinases afin d'assurer une coupure séquentielle des brins d'ADN. Ce système très élaboré d'activation séquentielle des recombinases est soumis à de nombreux contrôles, assurant qu'une seule paire de recombinases soit active à un instant donné. Par ailleurs, ce système séquentiel est très flexible, l'ordre d'échange des brins peut être permuté ou un seul échange de brin peut être effectué donnant naissance à des produits de recombinaisons différents. Il est donc soumis à différents systèmes de régulation qui vont décider du devenir de la réaction.

I.2. Les recombinases à tyrosine

La famille des recombinases à tyrosine est une très grande famille composée d'enzymes catalysant des recombinaisons spécifiques de site en formant un complexe actif sous forme **tétramérique**. D'autres enzymes étroitement apparentées, les topoisomérases de type 1B et les résolvases de télomères ResT et TelN, partagent des mécanismes et résidus catalytiques analogues aux recombinases à tyrosine. Les topoisomérases de type 1B fonctionnent sous forme **monomérique**, elles catalysent le relâchement de l'ADN en introduisant des coupures simple brin permettant l'élimination de super-tours avant religation de ces même brins (Sherratt & Wigley, 1998). L'étude de ces topoisomérases et plus

particulièrement de la topoisomérase 1B du virus de la Vaccinia a permis de faire de grandes avancées sur le mécanisme catalytique des recombinases à tyrosine et l'identification de nouveaux résidus catalytiques (Van Duyne, 2002). Les résolvases de télomères de réplicons linéaires, ResT (Borrelia burgdorferi) et TelN (phage N15) utilisent un mécanisme catalytique également comparable aux recombinases à tyrosine (Deneke *et al.*, 2000, Kobryn & Chaconas, 2002, Deneke *et al.*, 2004). Cependant, ResT fonctionne sous forme **dimérique** en ciblant des sites parfaitement palindromiques dont la recombinaison produit soit la résolution des télomères après réplication soit la fusion de deux chromosomes linéaires (Kobryn & Chaconas, 2002, Kobryn & Chaconas, 2005).

I.2.1. Organisation structurale des recombinases à tyrosine

Les recombinases à tyrosine s'organisent ordinairement en deux domaines N- et C-terminaux. Leurs séquences primaires sont très faiblement conservées. Leurs parties carboxy-terminales présentent néanmoins plus de similitude que leurs parties amino-terminales (Esposito & Scocca, 1997). En effet, le domaine C-terminal comprend le domaine catalytique qui contient des résidus invariants.

Les structures cristallographiques des recombinases Cre (Guo *et al.*, 1997), Flp (Chen *et al.*, 2000) , IntHP1 (Hickman *et al.*, 1997), Intλ (Kwon *et al.*, 1997, Aihara *et al.*, 2003, Biswas *et al.*, 2005), VchIntIA (MacDonald *et al.*, 2006) et XerD (Subramanya *et al.*, 1997) montrent que leurs domaines N- et C-terminaux s'arrangent en domaines globulaires qui sont reliés par une boucle flexible (Figure 3a).

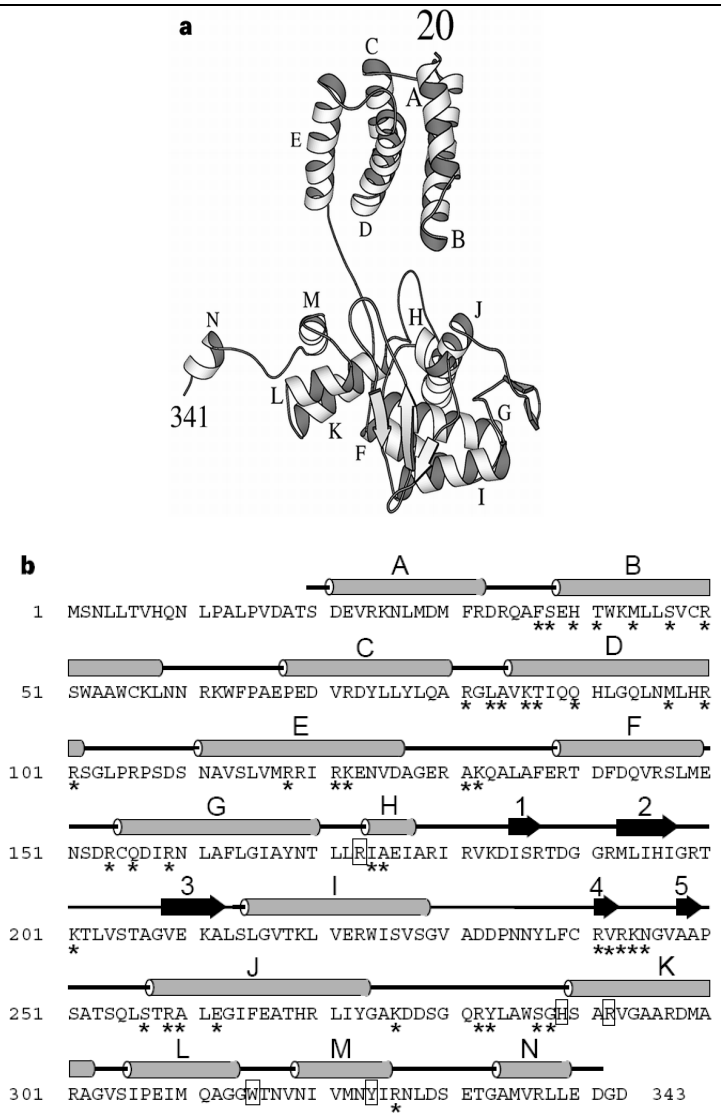


Figure 3. (a) Structure cristallographique de Cre (b) Structure secondaire de Cre (Guo et al., 1997).
Les hélices α sont numérotées de A à N. Les extrémités amino- et carboxy-terminales sont indiquées par le numéro de résidus. Les résidus catalytiques Arg (173), Lys (201), His (289), Arg (292), Trp (315) et Tyr (324) sont encadrés. L'hélice M porte la tyrosine faisant l'attaque nucléophile.

Les recombinases Cre, XerC/D et la topoisomérase IB du virus de la Vaccinia ont des parties C- et N-terminales de même taille (Figure 4). Par contre, le domaine N-terminal de FimB et FimE est quasi inexistant alors qu'Intλ possède un domaine N-terminal additionnel. Flp possède un prolongement dans la partie C-terminale. IntI1 présente un segment additionnel. Ces différences structurales au sein de la famille

des recombinases à tyrosine reflètent des différences fonctionnelles dont certaines seront illustrées par la suite.

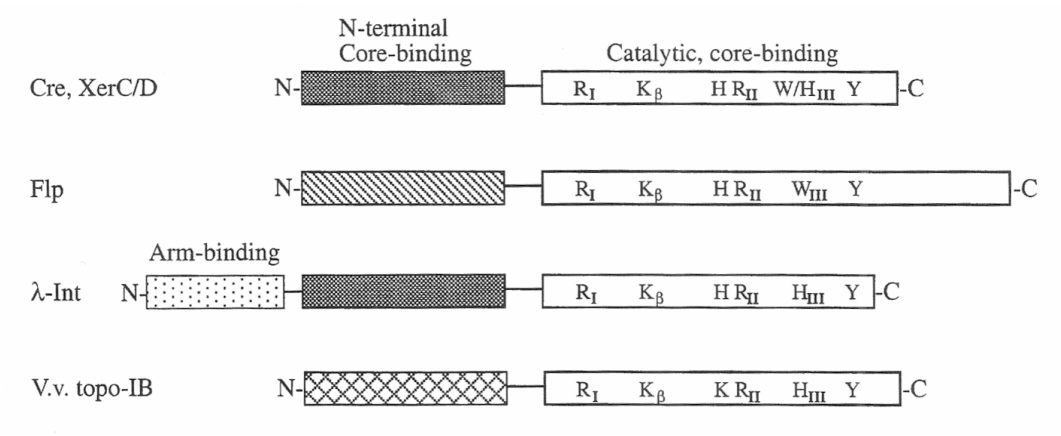


Figure 4. Comparaison de l'organisation en domaines N- et C-terminaux des recombinases à tyrosine (Cre, XerC/D, Flp et λ-Int) et de la topoisomérase IB du virus de la Vaccinia (V.v. topo-IB) (Van Duyne, 2002).
Les résidus catalytiques portés par le domaine C-terminal sont indiqués (RI, Kβ, H, RII, W/HIII, Y).

I.2.2. Les résidus catalytiques du site actif

Six résidus catalytiques invariants ont été identifiés dans la partie carboxy-terminal des recombinases Arg (I), Lys (β), His (II), Arg(II), His/Trp (III), et Tyr (Figure 3 b et Figure 4). Ce motif RKHR[H/W]Y est la signature des recombinases à tyrosine. C'est la tyrosine qui va faire une attaque nucléophile sur une liaison phosphodiester de l'ADN (Figure 5). Les autres résidus catalytiques permettent d'exposer la liaison phosphodiester qui devient sensible à l'attaque nucléophile de la tyrosine (Van Duyne, 2002). Ils permettent également de stabiliser l'intermédiaire phosphate transitoire penta-coordiné (Van Duyne, 2002). La lysine (β) a été identifiée chez la topoisomérase IB comme étant l'acide responsable de la protonation du groupe 5'OH libéré pendant l'attaque nucléophile (Krogh & Shuman, 2000).

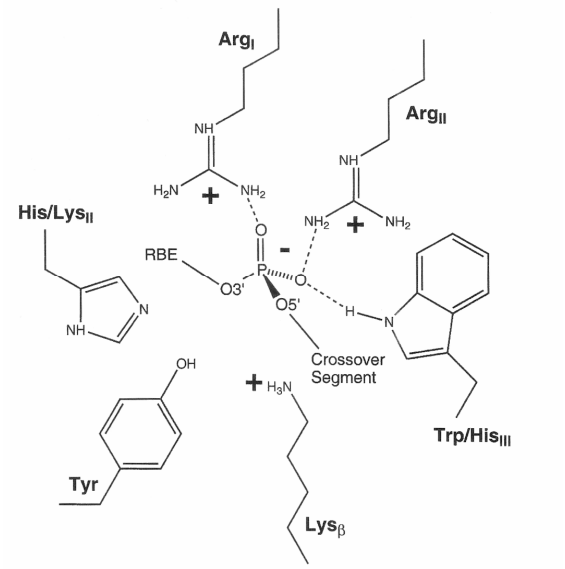


Figure 5. Représentation schématique du site actif des recombinases à tyrosine et du phosphate scissile du site de recombinaison (Van Duyne, 2002).
Seuls les résidus catalytiques Arg (I), Lys (β), His (II), Arg(II), His/Trp (III), et Tyr sont montrés. Le site de fixation des recombinases dénommé 'RBE' flanque le coté 3' du phosphate scissile. La région centrale dénommée 'Crossover Segment' flanque le côté 5' du phosphate scissile.

I.2.3. La fixation des recombinases à l'ADN

I.2.3.1. Structure d'un site de recombinaison spécifique

Le site minimal de recombinaison spécifique, appelé site 'core', est composé de deux séquences inversées de fixation spécifique des recombinases, séparées par une séquence généralement asymétrique, appelée région centrale (Figure 6 a). La région centrale est le lieu de coupure et de ligation de l'ADN, qui fournit l'homologie de séquence permettant l'échange de brin. A l'inverse de la région centrale, les sites de fixation des recombinases ne sont pas nécessairement identiques, et même le consensus entre les quatre sites de fixation peut être assez lâche. En plus du site core, le site de recombinaison peut comprendre des sites secondaires qui permettent la fixation de protéines accessoires et/ou des recombinases elles-mêmes requises pour une formation correcte et la stabilisation du complexe synaptique (Figure 6 b,c).

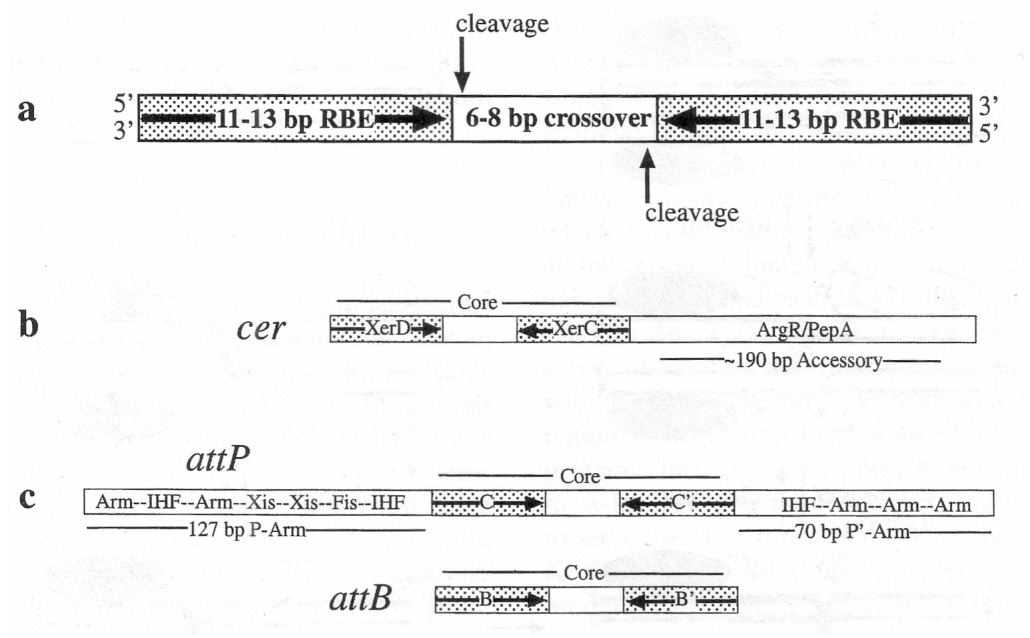


Figure 6. Organisation des sites de recombinaison des recombinases à tyrosine (Van Duyne, 2002).
(a) Structure du site minimal (site core) composé de deux sites de fixation des recombinases (RBE) disposés en répétition inverse autour d'une région centrale (crossover) qui est la région d'échange des brins d'ADN. Les sites de coupures sont indiqués par des flêches, la coupure a lieu à la frontière entre les sites de fixation des recombinases et la région centrale. (b) Site *cer* de résolution des multimères du plasmide ColE1. En plus du site core, 190 pb de séquences accessoires adjacent au site core permettent la fixation de protéines accessoires (ArgR et PepA). (c) Sites d'intégrations du bactériophage λ. Le site *att*P du phage est composé d'un site core entouré par deux séquences accessoires (bras P et P') permettant la fixation des domaines N-ter des recombinases, de la protéine IHF et de deux protéines Xis et Fis qui stimulent la réaction d'excision. Le site *att*B chromosomique est constitué uniquement d'un site core.

I.2.3.2. La fixation des recombinases au site core

Les données structurales de Cre avec son substrat ADN montrent que la recombinase s'agrippe à l'ADN telle une pince avec ses domaines N- et C-terminaux se fixant sur deux faces opposées de l'ADN (Guo et al., 1997). Le domaine N-ter interagit avec le grand sillon de l'ADN près de la région centrale du site core, et le domaine C-ter interagit avec le grand et les petits sillons adjacents de la face opposée de l'ADN (Figure 7).

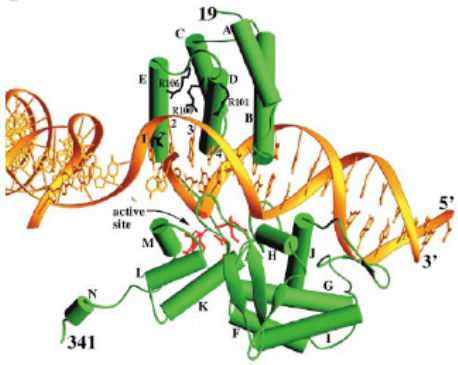


Figure 7. Structure d'un protomère de Cre (vert) fixé sur son site de recombinaison (jaune) (Gopaul *et al.*, 1998).
Les résidus du site actifs et le phosphate scissile sont représentés en rouge. Les hélices α sont numérotées de A à N. Les extrémités amino- et carboxy-terminales sont indiquées par le numéro de résidus.

I.2.3.3. La fixation des recombinases aux séquences accessoires

Les recombinases peuvent également se lier à l'ADN sur des sites secondaires situés en périphérie du site core. C'est le cas de l'intégrase Intλ du phage Lambda, sa partie N-terminale possède un domaine supplémentaire qui contact des séquences secondaires du site de recombinaison *att*P du phage Lambda (Biswas et al., 2005). Sur le site accessoire, la fixation de la recombinase a un rôle architectural dans la formation et la stabilisation du complexe synaptique (Figure 8).

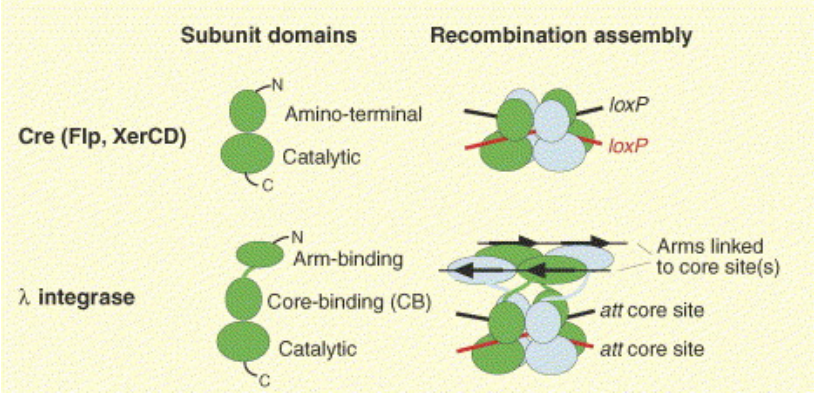


Figure 8. Comparaison de la fixation de Intλ par rapport à des recombinases plus simples Cre, Flp et XerC/D (Van Duyne, 2005).
Les recombinases à tyrosine telles que Cre se fixent uniquement au site core par leur domaines N- et C-terminaux. La recombinase Intλ se fixe non seulement sur le site core mais aussi sur des séquences accessoires du site *att*P (noir) par l'intermédiaire de son domaine N-terminal additionnel. Les recombinases fixées sur le site core *att*B (rouge) se fixent aussi sur les séquences accessoires du site *att*P.

I.2.4. Structure du complexe synaptique

La liaison des recombinases sur leur site de fixation est coopérative, ce qui démontre que les recombinases interagissent entre elles. La structure quaternaire de la synapse est quasi-plane et demeure inchangée au cours des différentes étapes de la recombinaison (Guo *et al.*, 1999). Les domaines N-terminaux forment un réseau de contacts inter-protomères sur une face de l'ADN, tandis que les domaines C-terminaux de Cre interagissent avec les protomères voisins sur la face opposée de l'ADN.

L'interaction des domaines N-ter permet de structurer de manière rigide la synapse (Guo *et al.*, 1999). La structure du complexe synaptique de Cre montre que les domaines N-ter forment une interface protéine-protéine avec les autres protomères pour s'assembler en complexe tétramérique (Guo et al., 1997, Guo *et al.*, 1999). Les monomères de Flp n'ont pas les mêmes contacts dans la synapse que Cre. Leurs domaines N-ter n'interagissent pas entre eux mais avec le boucle reliant les deux domaines N- et C-ter du protomère voisin (Van Duyne, 2002).

Chez Cre, les domaines C-terminaux interagissent entre eux via un échange cyclique des hélices C-terminales, où une courte hélice d'une recombinase va interagir avec le domaine catalytique de la recombinase voisine (Figure 9) (Guo et al., 1997).

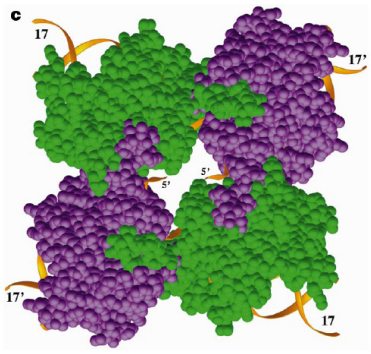


Figure 9. Modèle du complexe synaptique Cre/loxP (Guo et al., 1997).
Vue de la synapse du côté C-terminal montrant les interactions cycliques entre les sous-unités impliquant les segments C-terminaux de Cre.

Comme pour Cre, les domaines C-terminaux des recombinases Flp forment un réseau d'interactions cycliques au sein de la synapse. Cependant, c'est l'hélice M portant la tyrosine nucléophile qui est échangée avec le monomère voisin (Figure 10). La tyrosine nucléophile est par conséquent fournit en trans à la recombinase voisine.

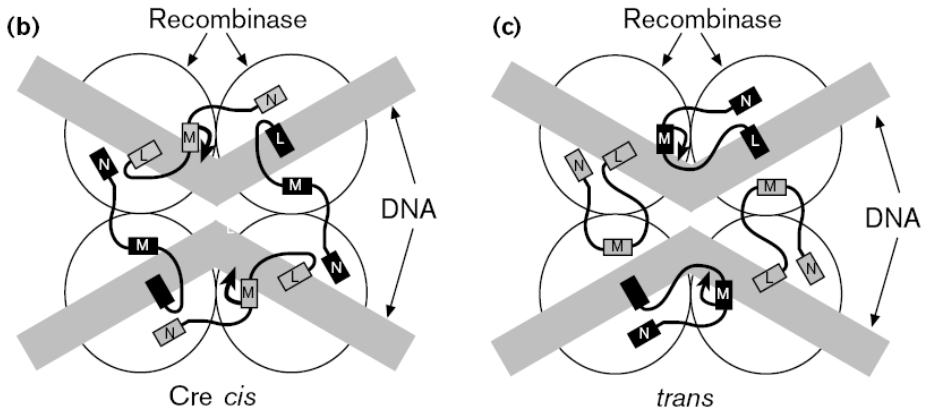


Figure 10. Schéma de la structure synaptique représentant un clivage en cis ou en trans par la tyrosine catalytique (Gopaul & Duyne, 1999).
Seules les hélices L, M et N du domaine C-terminal sont représentées. A gauche : cas de Cre, l'hélice N est donnée en trans à la sous-unité adjacente et l'hélice M portant la tyrosine catalytique est lié en cis. A droite : cas de Flp, l'hélice M portant la tyrosine catalytique est donnée en trans à la sous-unité adjacente, l'hélice N interagit en cis.

I.2.5. Activation séquentielle des recombinases à tyrosine

Le mode de coupure séquentiel des recombinases à tyrosine implique que dans le complexe synaptique deux protomères soient actifs et deux inactifs. Chaque monomère du complexe synaptique a son extrémité C-terminale (région donneuse) qui contacte le monomère voisin près de son site actif (région acceptrice) (Guo et al., 1997). Les deux recombinases actives ont leurs extrémités C-terminales en conformation étendue (Figure 11). Cette conformation étendue permet de positionner leurs tyrosines nucléophiles à proximité des phosphates scissiles (Guo et al., 1997). Les deux recombinases inactives ont leurs extrémités C-terminales en conformation relâchée et leurs tyrosines nucléophiles ne peuvent pas accéder les phosphates

scissiles (Guo et al., 1997). Un changement conformationnel de la synapse permet d'activer les recombinases préalablement inactives et vice versa (Hallet et al., 1999).

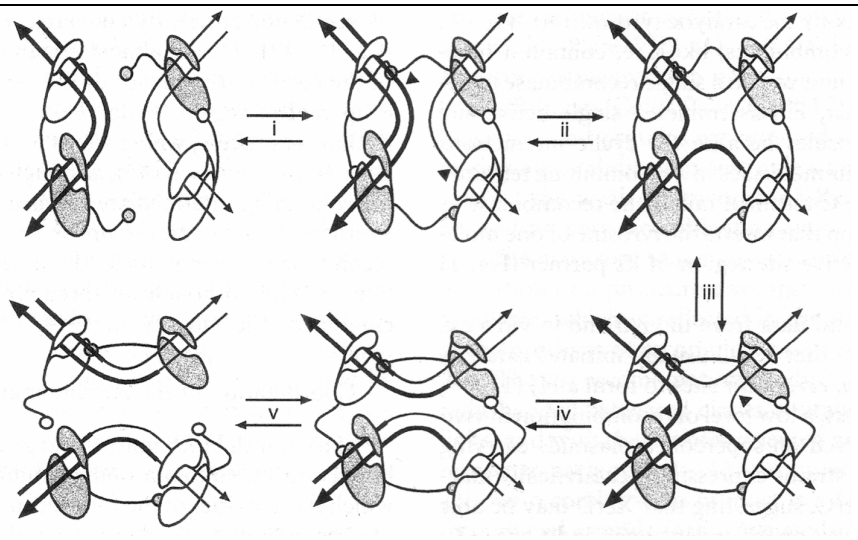


Figure 11. Modèle d'activation séquentielle et d'inhibition réciproque des paires de recombinases (Barre & Sherratt, 2002).
Le schéma montre les interactions cycliques entres les régions donneuses et acceptrices des protomères voisins. Les recombinases XerC et XerD sont représentées en blanc et gris respectivement. Leur domaine N-ter (plus petit) est représenté au-dessus de l'ADN est le domaine C-ter est représenté en dessous. Les deux recombinases actives pour cliver ont leur domaine C-ter en conformation étendue tandis que les deux autres recombinases ont leur domaine C-ter relâché. Les triangles noirs indiquent le site de coupure et de religation de l'ADN. L'ADN des deux sites partenaires est représenté différemment (trait épais et fin) afin de suivre l'échange de brin. (i) Formation de la synapse (ii) Premier échange de brin par XerC (iii) Isomérisation de la jonction de Holliday (iv) Deuxième échange de brin par XerD (v) Désassemblage de la synapse.

I.2.6. Mécanisme séquentiel d'échange des brins

Les résidus catalytiques du site actif des protomères actifs fragilisent une liaison phosphodiester de l'ADN qui devient sensible à une attaque nucléophile par le groupe hydroxyle de la tyrosine catalytique. Il en résulte un premier clivage de brin entre la séquence de fixation des recombinases et la région centrale à l'issue duquel le résidu tyrosine est lié à l'extrémité clivée 3' de l'ADN par une liaison 3'-phosphotyrosyl (Figure 12).

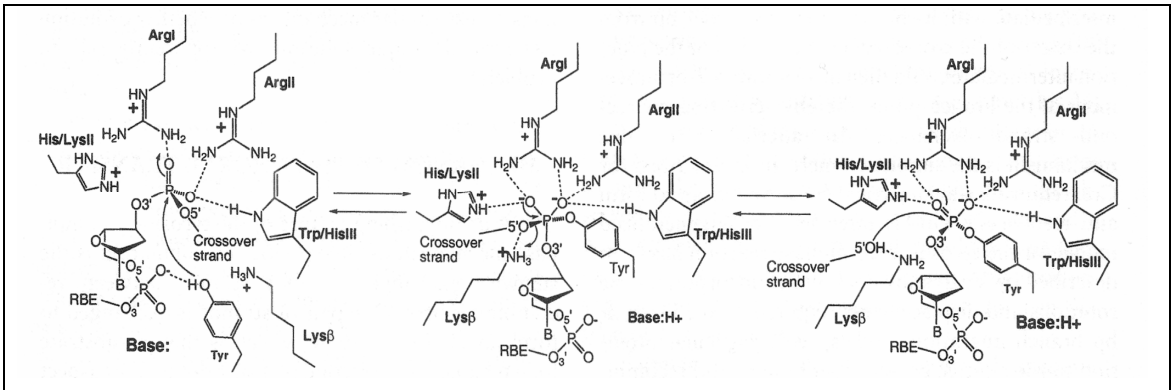


Figure 12. Mécanisme de coupure et de ligation des recombinases à tyrosine par réaction de transesterification (Van Duyne, 2002).
La coupure est effectuée par une attaque nucléophile du groupe hydroxyl de la tyrosine catalytique sur un phosphate de l'ADN, résultant en la formation d'un intermédiaire covalent 3'-phosphotyrosyl et d'une extrémité libre 5'OH. L'acide responsable de la protonation du groupe sortant 5'OH a été identifié comme étant le résidu Lys-β chez les topoisomérase de type IB. L'étape de ligation consiste en la réaction inverse, le groupe hydroxyl 5'OH fait une attaque nucléophile sur l'intermédiaire 3'-phosphotyrosyl.

L'autre extrémité, libérée sous forme 5'-OH, s'apparie par complémentarité de base sur le brin opposé (Figure 13). Les données cristallographiques obtenues avec Cre / *lox*P montrent que trois bases sont testées pour leur homologie (Guo et al., 1997). L'extrémité 5'OH fait alors une attaque nucléophile d'un phosphotyrosyl sur un complexe recombinase/ADN adjacent, reformant ainsi une liaison phosphodiester ADN/ADN. Une paire d'échange de brin résulte en la formation d'un intermédiaire de jonction de Holliday. Un remodelage du complexe synaptique est indispensable pour que le second cycle de coupure / religation intervienne. C'est l'étape d'isomérisation de la jonction de Holliday qui va induire ce changement conformationnel, les deux protomères préalablement actifs deviennent inactifs et vice-versa. Les deux protomères activés se mettent en position d'effectuer un second échange de brin par un processus identique conduisant à la résolution de la jonction de Holliday.

Bien que ce mécanisme soit conservé chez la plupart des recombinases à tyrosine étudiée à ce jour, il existe quelques intégrases dont le mécanisme de catalyse présente des variantes.

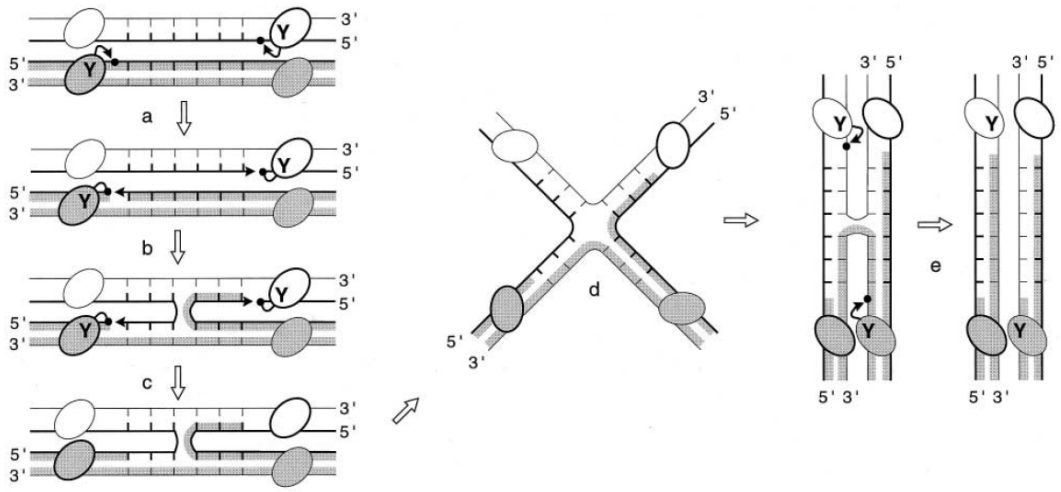


Figure 13. Mécanisme séquentiel d'échange de brins par les recombinases à tyrosine (Hallet & Sherratt, 1997).
Sur cette figure le détail des bases de la région centrale est représenté (un trait correspond à une base) afin de mettre en évidence l'importance de l'homologie de séquence de la région centrale entre les sites partenaires dans l'échange des brins (b) et la nécessité d'une orientation antiparallèle des sites dans la synapse. Les recombinases sont représentées par des ovales avec le résidu catalytique 'Y'. Les flèches noires représentent l'attaque nucléophile des phosphates scissiles par les groupements hydroxyles des résidus catalytiques. Les arcs noirs représentent la liaison covalente entre le résidu catalytique et le phosphate scissile de l'ADN. (a) clivage de deux brins (b) échange des brins (c) ligation (d) isomérisation de la jonction de Holliday (e) clivage au niveau des deux autres brins (e) échange et ligation.

Par exemple, le clivage de l'ADN par les recombinases se fait en *cis* dans la majorité des intégrases étudiées. C'est le cas des recombinases Intλ, Cre et XerCD (Nunes-Duby *et al.*, 1994, Arciszewska *et al.*, 1995, Guo et al., 1997). Tandis que Flp, dont la tyrosine nucléophile est échangée avec la recombinase voisine, fait un clivage de l'ADN en *trans* (Lee *et al.*, 1999, Chen *et al.*, 1992). Pendant longtemps Flp a été l'unique représentant connu des recombinases clivant en trans, mais une autre intégrase Int^{SSV} codée par le virus d'une Archae thermophile a été identifiée comme clivant en *trans* (Letzelter *et al.*, 2004, Serre *et al.*, 2002). Un autre exemple de variante est le suivant : la nécessité d'une homologie de séquence entre les régions centrales des deux sites partenaires pour établir une jonction d'Holliday (Nunes-Duby et al., 1995) a été remise en question par des travaux portant sur deux intégrases (IntN1 et IntDOT) de transposons conjugatifs (NBU1 et CTnDOT respectivement) de

souches bacteroïdes. Les études s'accordent pour dire que ces intégrases catalysent un échange séquentiel de brins d'ADN avec formation d'un intermédiaire de jonction de Holliday sans nécessiter d'homologie de séquence (Rajeev *et al.*, 2007, Schmidt *et al.*, 2006, Malanowska *et al.*, 2007). Par ailleurs, les sites *att*I des différents intégrons et les sites *att*C associés aux cassettes de gènes ne partagent pas d'homologie dans leur région centrale mais peuvent cependant être recombinés entre eux sous l'action de l'intégrase IntI (Bouvier *et al.*, 2005). Il apparait donc que les recombinases à tyrosine se soient diversifiées pour s'adapter à diverses fonctions et que leur étude nous réserve encore de nombreuses surprises.

I.2.7. Contrôle de la recombinaison

I.2.7.1. Sélectivité de brin

Le mode de coupure des recombinases à tyrosine implique que deux paires de brins soient clivés séquentiellement. Dans la plupart des systèmes de recombinaison, le brin échangé en premier est prédéterminé, c'est ce qu'on appelle la sélectivité de brin. La sélectivité de brin permet que la coupure soit initiée au même site sur les deux brins pour avoir un échange productif. Les deux recombinases actives sont diagonalement opposées dans le complexe synaptique. C'est la conformation adoptée par la synapse qui détermine l'accessibilité du site actif des recombinases au phosphate scissile et par conséquent quel brin sera coupé en premier. Chez Cre, la sélectivité de brin est liée aux dinucléotides scissiles bordant la région centrale du site *lox*P qui provoquent une courbure asymétrique de l'ADN dans la synapse (Guo et al., 1999, Lee et al., 2003, Lee & Sadowski, 2003). Chez IntI, une seule base extra-hélicoïdale du site *att*C simple brin est responsable de la sélectivité de brin (Bouvier et al., en soumission). La sélectivité de brin peut également être influencée

par des facteurs accessoires. C'est le cas du système de recombinaison XerC/D que nous verrons par la suite et dont le premier clivage peut-être exercé soit par XerC soit par XerD. Dans tous les cas étudiés, le protomère activé est celui dont l'extrémité C-terminale interagit en cis avec l'autre protomère (Figure 14).

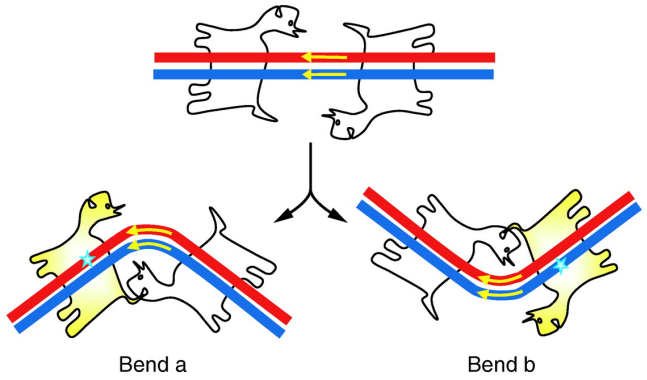


Figure 14. Déterminer quel brin sera coupé en premier (Grindley et al., 2006).
Les recombinases liées à un site ADN peuvent adopter deux angles de courbures qui va permettre de déterminer quel brin sera coupé en premier (étoile bleu).

I.2.7.2. Contrôle directionnel

Contrôler la directionalité de la recombinaison permet d'empêcher des réarrangements indésirables qui peuvent être détrimentaires aux fonctions biologiques des systèmes de recombinaison. Des contrôles sont exercés sur les systèmes de recombinaison afin de produire spécifiquement des inversions, délétions ou intégrations et empêcher des réactions inverses.

Dans les systèmes de recombinaison les plus simples, la séquence de la région centrale du site de recombinaison est seule à orienter la réaction de recombinaison. Du fait de l'asymétrie de la région centrale, bien que le complexe synaptique ait la possibilité de se former et d'effectuer le premier clivage de brin indépendamment de l'orientation relative des sites (parallèle ou anti-parallèle), seule la réaction entre sites antiparallèles sera productive. En effet, l'échange de brin entre des régions centrales

asymétriques en orientation parallèle est empêché à cause du mésappariements des bases (Figure 13 et Figure 15). La réaction inverse sera donc favorisée menant à la dissociation du complexe. Une absence d'asymétrie dans la région centrale conduit à des délétions ou des inversions de fragments d'ADN indépendamment de l'orientation relative des sites de recombinaisons (Hoess *et al.*, 1986, Senecoff & Cox, 1986). Une perte de directionalité de la recombinaison est observée lorsque la région centrale des sites *FRT* est remplacée par une séquence symétrique (Senecoff & Cox, 1986).

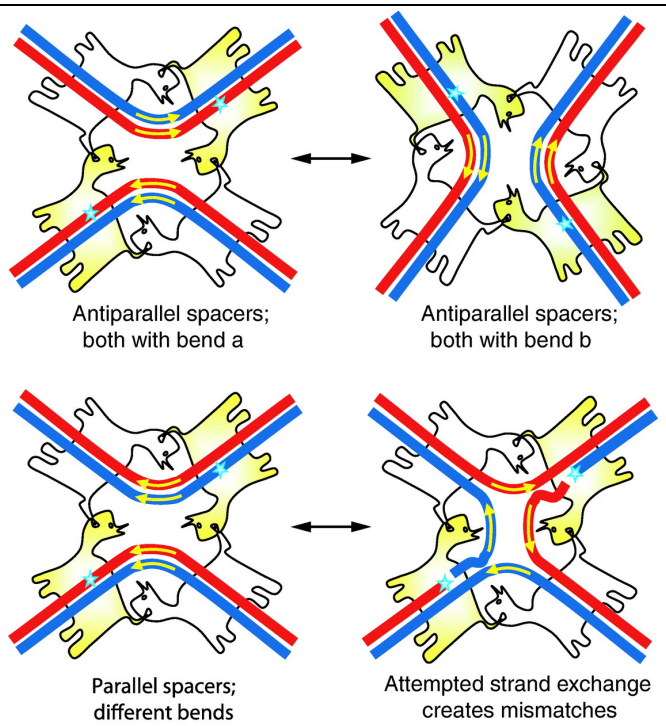


Figure 15. Contrôle directionnel de la recombinaison par l'asymétrie de la région centrale du site core (Grindley et al., 2006).
L'assemblage de la synapse peut se faire avec les sites parallèles ou antiparallèles mais seuls la recombinaison entre site antiparallèle est productive.

Dans le cas des systèmes de recombinaison impliquant deux partenaires différents telles que XerC/XerD ou FimB/FimE, il y a asymétrie de part la nature différente des recombinases et de leur site de fixation. En effet, deux recombinases différentes reconnaissent spécifiquement un seul côté du site de recombinaison, et dans la

synapse les interactions se font entre hétéromères. Lorsque l'on remplace la région centrale du site *dif* des recombinases XerC/D par une séquence symétrique, le contrôle directionnel n'est pas perdu (Blakely *et al.*, 1993) ce qui signifie que seule la formation de la synapse entre sites antiparallèles est productive. Cette asymétrie est donc suffisante pour contrôler la directionalité de la recombinaison puisque l'assemblage de la synapse entre deux sites parallèles modifie et annihile les interactions entre hétéromères.

Lorsque les sites core sont accompagnés de sites accessoires, les protéines accessoires vont exercer un rôle structural en introduisant des modifications topologiques de l'ADN. Par exemple, l'intégration et l'excision du phage Lambda nécessitent un certain nombre de contraintes topologiques pour intervenir et si le catalyseur est toujours l'intégrase, de nombreux autres partenaires protéiques vont intervenir pour guider la réaction dans le sens de l'intégration ou de l'excision. Les protéines accessoires peuvent être des facteurs hôtes comme IHF, des facteurs phagiques comme Xis ou les recombinases elles-mêmes qui sur les sites secondaires n'exerceront pas une activité catalytique mais un rôle architectural. C'est aussi le cas du transposon Tn4430 dont la fixation des recombinases TnpI sur des sites secondaires, DRI et DR2, participent au contrôle de la directionalité de la recombinaison (Vanhooff *et al.*, 2006).

II. LA RECOMBINAISON XER

Le système Xer est un système de recombinaison spécifique de site impliqué dans la maintenance des génomes. Il intervient au niveau de la ségrégation des chromosomes circulaires chez la plupart des bactéries.

II.1. Les recombinases XerC et XerD

II.1.1. Généralités sur les recombinases XerC et XerD

La recombinaison spécifique de site Xer, a été découverte initialement en 1984 chez *E. coli* à travers son rôle dans la stabilité du plasmide ColE1 (Summers & Sherratt, 1984). La recombinaison Xer au site *cer* permet la conversion de multimères de plasmides ColE1 en monomères. L'étude des mutants défectifs de la recombinaison au site *cer*, obtenus par mutagénèse aléatoire, à permis d'identifier les gènes argR et pepA (Stirling *et al.*, 1988a, Stirling *et al.*, 1988b) qui codent pour les protéines accessoires de la réaction de recombinaison. Plus tard, le gène *xer*C, codant pour une des deux recombinases du système Xer, fut identifié de la même manière (Colloms *et al.*, 1990). Peu après, il a été montré que XerC jouait un rôle dans la ségrégation des chromosomes chez *E. coli* en participant à la résolution des dimères de chromosomes formés par recombinaison homologue (Blakely et al., 1991, Kuempel *et al.*, 1991, Clerget, 1991). Sur la base de sa similarité avec XerC, une seconde recombinase XerD, a été identifiée en 1993 (Blakely et al., 1993). XerD fonctionne de paire avec XerC pour catalyser des évènements de recombinaison spécifique de site (Blakely et al., 1993). XerC et XerD partagent 37% d'identité et du fait de la grande diversité de la famille des recombinases à tyrosine, elles sont phylogénétiquement voisines. XerC et XerD sont retrouvées dans la majeur partie des bactéries à chromosome circulaire possédant un système de recombinaison

homologue (Figure 16) (Recchia & Sherratt, 1999). De manière assez surprenante, les gènes *xer*C et *xer*D sont généralement distants sur le chromosome (Recchia & Sherratt, 1999). L'étude des recombinases XerC/D et de leurs particularités s'est étendue à d'autres organismes (Villion & Szatmari, 1998, Neilson *et al.*, 1999, Sciochetti *et al.*, 1999, Chalker *et al.*, 2000, Sciochetti *et al.*, 2001, Jouan & Szatmari, 2003, Villion & Szatmari, 2003, Bui *et al.*, 2006, Le Bourgeois *et al.*, 2007, Hayes *et al.*, 1997). Récemment, il a été observé qu'une seule recombinase XerS assure la fonction des deux recombinases XerCD chez les Streptococci et Lactococci dans la résolution des dimères de chromosomes (Le Bourgeois et al., 2007). Par ailleurs, de nouvelles fonctions de la recombinaison Xer ont été découvertes, elle semble être impliquée dans la décaténation des chromosomes (Ip *et al.*, 2003, Grainge *et al.*, 2007) et l'intégration chromosomique d'éléments exogènes (Huber & Waldor, 2002). La pluralité des fonctions de la recombinaison Xer est le reflet d'une grande flexibilité du système dont la recherche des déterminants alimente depuis longtemps la curiosité des chercheurs.

II.1.2. Le Modèle des recombinases XerC/D

Malgré la divergence des séquences primaires de XerC/D et Cre (Esposito & Scocca, 1997), la structure d'un monomère de XerD présentent une grande similarité avec celle de Cre (Subramanya et al., 1997, Guo et al., 1997). Ainsi, les connaissances acquises des structures de Cre en complexe synaptique ont pu être extrapolées aux recombinases XerC/D et ont permis de mettre en évidence les interactions des monomères avec l'ADN ou avec les monomères voisins (Arciszewska et al., 2000, Ferreira *et al.*, 2003, Hallet et al., 1999, Spiers & Sherratt, 1999).

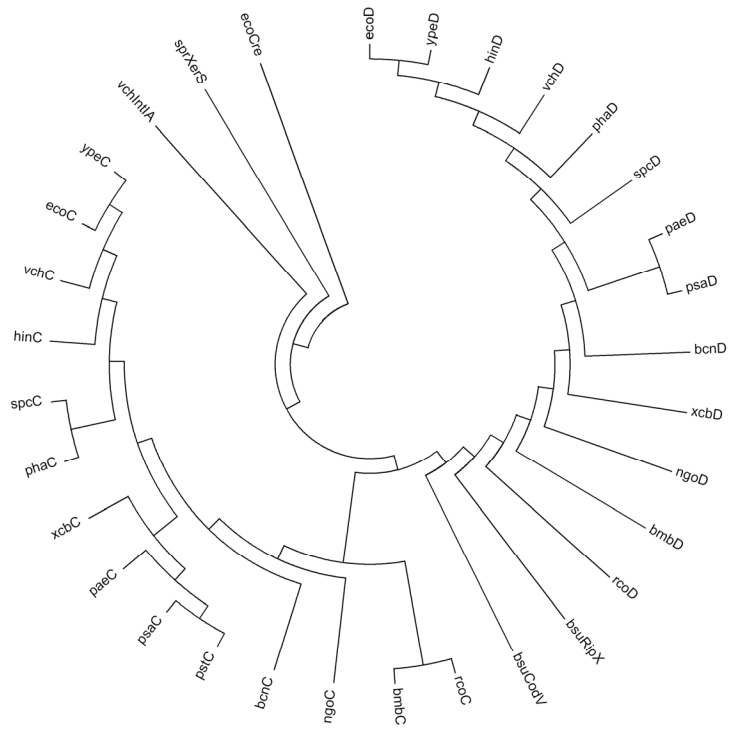


Figure 16. Cladogramme Radial des proteines XerC et XerD (S.P. Kennedy).
Quatorze séquences de protéines XerC et XerD de protéobactéries sont représentées. De plus, sont incluent les séquences de CodV et RipX qui sont les orthologues de XerC et XerD chez *B. subtilis*. XerS, Cre et IntIA ont été utilisés en tant que recombinases spécifique de site lointainement reliée aux recombinases XerC et XerD pour ancrer l'arbre phylogénétique. La représentation graphique a été générée par MEGA 4 utilisant la méthode de 'neighbour-joining' et à partir d'un alignement généré par ClustalW (ver. 1.83). La nomenclature KEGG est utilisée pour désigner les organismes. XerC et XerD sont indiquées respectivement par un C et un D après le nom de l'organisme.

Dans le système XerCD, les monomères sont des protéines distinctes qui se fixent spécifiquement sur des séquences différentes, de part et d'autre de la région centrale. Grâce à cette particularité, la recombinaison Xer est devenue un excellent modèle d'étude du contrôle séquentiel des recombinases dans la recombinaison (Spiers & Sherratt, 1999, Arciszewska *et al.*, 2000, Hallet et al., 1999, Arciszewska et al., 1997). L'altération de l'interaction entre l'extrémité C-terminale de XerC et la région acceptrice de XerD inhibe l'activation de XerC et stimule l'activité catalytique de XerD. Réciproquement l'altération de l'interaction entre l'extrémité C-terminale de XerD et la région acceptrice de XerC inhibe XerD et stimule XerC (Hallet et al., 1999). XerC et XerD se contrôlent l'une l'autre de manière à s'activer et s'inhiber

réciproquement permettant une activation séquentielle des paires de recombinases pendant la recombinaison (Hallet et al., 1999).

II.1.3. Mécanisme catalytique des recombinases XerC et XerD

Les recombinases se fixent spécifiquement et de manière coopérative (Blakely & Sherratt, 1994, Blakely et al., 1993) sur des séquences de 11 pb qui sont séparées par une région centrale de 6-8 pb.

Comme les topoisomérases de type IB, les recombinases XerC et XerD exercent isolément une activité de relâchement de l'ADN au niveau de leur site de recombinaison (Cornet *et al.*, 1997). En présence des deux partenaires sur le site de recombinaison, l'interaction entre les recombinases dans l'hétéro-dimère inhibe leur activité topoisomérase (Cornet et al., 1997).

Les recombinases XerC et XerD forment un complexe synaptique hétéro-tétramérique composé de deux sites ADN fixant chacun deux hétéro-dimères XerC/XerD. Comme pour Cre, le clivage des recombinases XerC/D est effectué en *cis* (Blakely *et al.*, 1997). L'échange de brin se fait de manière séquentielle en passant par un intermédiaire de jonction de Holliday (Blakely *et al.*, 2000). L'ordre d'échange des brins n'est pas toujours le même et selon la conformation de la synapse, la paire XerC ou la paire XerD sera active pour initier le premier clivage de brin. Par convention, on appelle le brin 'Top', le brin coupé par XerC et le brin 'Bottom', le brin coupé par XerD (Blakely *et al.*, 1997). Après le premier échange de brins et formation d'une jonction de Holliday, trois voies distinctes peuvent être empruntée (Figure 17). (1) Le mécanisme inverse est catalysé par la même paire de recombinase ou (2) un changement de conformation de la jonction de Holliday permet d'activer l'autre paire de recombinase ou (3) les jonctions de Holliday ne sont ni résolues par l'autre paires de recombinases, ni reconverties en substrat, mais

résolues par d'autres facteurs cellulaires non identifiés à ce jour. Seules les voies (2) et (3) conduisent à la formation de produits de crossover.

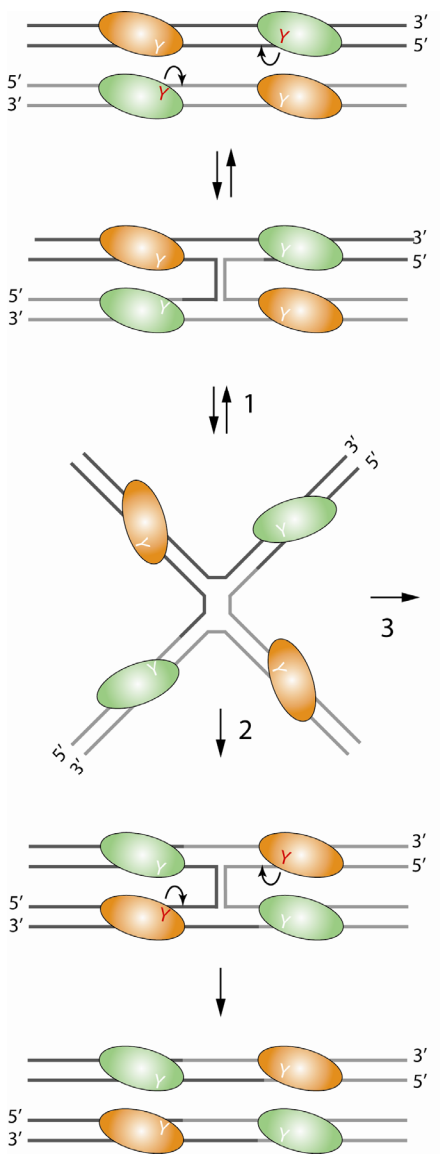


Figure 17. Les trois voies possibles de résolution de la jonction de Holliday catalysée par recombinaison Xer.
(1) Reconversion de la jonction de Holliday en substrat
(2) Deuxième échange de brin catalysé par l'autre paire de recombinase
(3) Résolution de la jonction de Holliday par d'autres par cellulaires (HJ resolvases, réplication).

II.2. Les fonctions de la recombinaison Xer

Les fonctions du système Xer sont multiples. Il est impliqué dans la ségrégation de réplicons circulaires par résolution de multimères de plasmides et de chromosomes et par décaténation de chromosomes. Il peut aussi être détourné de sa fonction cellulaire pour permettre l'intégration chromosomique de matériel génétique exogène.

II.2.1. Résolution des multimères de plasmides

II.2.1.1. Origines des multimères de plasmides

Des multimères de plasmides peuvent être formés soit par recombinaison homologue soit par réplication (Figure 18).

- Des formes dimériques et multimériques de plasmides peuvent se former par crossover entre deux plasmides frères lors de la recombinaison homologue. La présence de ces formes multimériques est quasi absente dans un contexte *recA*- et plus particulièrement lorsque la voie RecFOR est inactivée (Kusano *et al.*, 1989).
- Des concatémères de plasmides peuvent être formés par réplication en cercle roulant durant la conjugaison (Warren & Clark, 1980).
- Dans certains cas, la réplication de certains plasmides linéaires mène à la formation de dimères (Chaconas *et al.*, 2001).

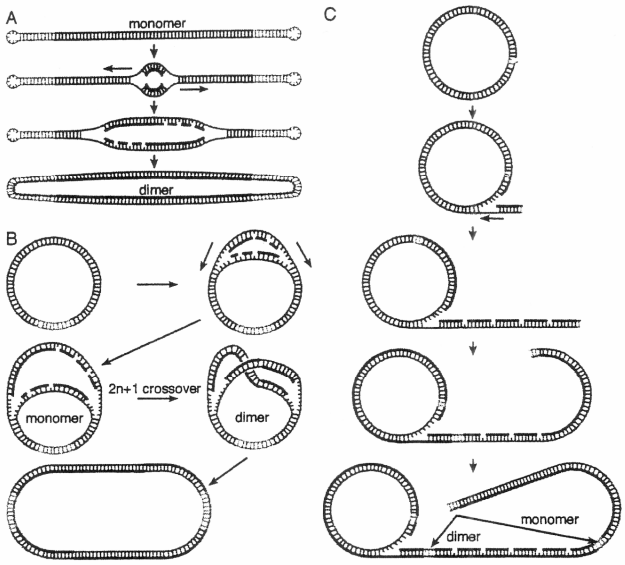


Figure 18. Diverses voies de formation de dimères par réplication (A et C) ou par recombinaison homologue (B) (Barre & Sherratt, 2002).
(A) Stratégie de réplication des réplicons linéaires de Borrelia. Les extrémités des réplicons sont fermés covalemment en structure d'épingle à cheveux. L'initiation interne bidirectionnelle de la réplication conduit à la production de réplicon dimérique. (B) Lors de la réplication de réplicons circulaires, un nombre impair de crossover effectués entre réplicons frères génère un réplicon dimérique. (C) Réplication par mécanisme de cercle roulant de réplicons circulaires. Après un cycle de réplication, la fourche de réplication peut continuer, ce qui mène à la formation de concatémères linéaires multimériques du réplicon.

La formation de multimères de plasmides est dommageable aux cellules car elle entraine une instabilité de la ségrégation des plasmides (Figure 19), un effet d'autant plus accentué que les plasmides multimériques présentent un avantage réplicatif par rapport aux plasmides monomériques (Summers *et al.*, 1993). Certains multimères de plasmides sont résolus par recombinaison spécifique de site pour être maintenu sous une forme monomérique stable (Summers & Sherratt, 1984). Le système Xer est spécialisé dans la résolution des formes multimériques de réplicons circulaires.

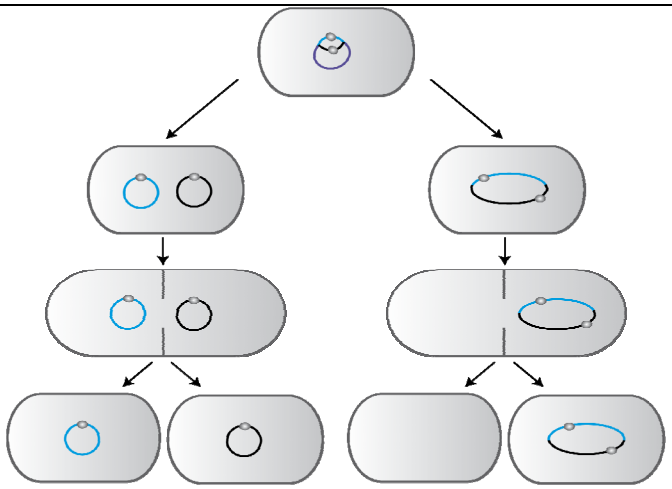


Figure 19. La multimérisation des plasmides provoque une instabilité de ségrégation.

II.2.1.2. Cas des plasmides ColE1 et pSC101

Deux systèmes de résolution des multimères de plasmides ont été extensivement étudiés. Les plasmides naturels ColE1 et pSC101 contiennent des sites de recombinaison spécifique de site, *cer* et *psi* respectivement, qui sont le substrat des recombinases XerC et XerD (Blakely et al., 1993, Cornet *et al.*, 1994). Les sites *cer* et *psi* sont constitués d'un site core et de séquences accessoires d'environ 180 pb (*cer)* et 160 pb (*psi)* adjacent au site de fixation de XerC. La recombinaison à *cer* nécessite les protéines accessoires ArgR et PepA (Stirling *et al.*, 1989, Stirling *et al.*, 1988a, Stirling *et al.*, 1988b). La recombinaison à *psi* ne nécessite pas ArgR, mais PepA et P-ArcA (ArcA phosphorylé) (Colloms *et al.*, 1998). ArgR, PepA et ArcA sont des facteurs de transcriptions que se lient à l'ADN spécifiquement sous forme héxamérique. Ces protéines ont un rôle architectural dans la formation de la synapse mais n'interviennent pas directement dans la catalyse.

Les sites *cer* et *psi* diffèrent principalement sur la taille de leur région centrale qui est de 6 pb pour *psi* et 8 pb pour *cer*. Afin d'avoir un contact optimal entre les recombinases, la taille de la région centrale doit normalement être de 6 pb. Deux

paires de bases supplémentaires dans la région centrale de *cer* équivaut à 6,8 Å et une rotation relative des recombinases de 69 º (Blakely & Sherratt, 1996). Une telle rotation et séparation des recombinases altère leurs interactions, il a donc été suggéré que les protéines accessoires permettent de favoriser les interactions entre les recombinases voisines (Blakely et al., 1993) en imposant une certaine structure à la synapse. A *psi*, la taille de la région centrale est idéale cependant l'affinité des recombinases pour leur site de fixation est faible. Il a été suggéré que dans le cas de *psi*, les protéines accessoires permettent de compenser le manque d'affinité des recombinases pour leur substrat en stabilisant la formation de la synapse (Sherratt *et al.*, 1995).

La recombinaison à *cer* et à *psi* a lieu dans un complexe nucléoprotéique dans lequel la séquence entre les sites de recombinaison est surenroulée négativement trois fois par les facteurs accessoires (Figure 20) (Colloms et al., 1997). Cette topologie particulière de la synapse permet de contrôler la directionalité de la recombinaison. La recombinaison aura lieu exclusivement intra-moléculairement entre deux sites placés en répétition directe afin d'assurer que les multimères de plasmides soit résolus en monomères et pas vice versa (Colloms et al., 1997).

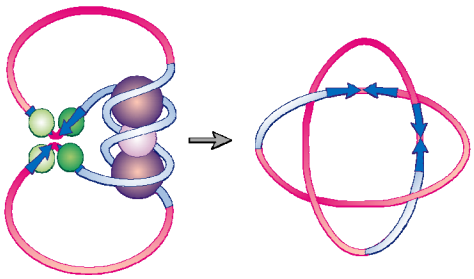


Figure 20. Formation d'une synapse à *psi* dans un dimère de plasmide pSC101.
Les recombinases XerCD sont représentées en vert sur leur site *psi* (flèches bleues foncées). PepA et ArcA sont représenté en violet et rose sur les séquences accessoires (bleu clair). *In vitro*, la topologie finale des produits de recombinaison à *psi* consiste en deux réplicons intercaténés.

Les facteurs accessoires déterminent également l'ordre d'échange des brins (Bregu *et al.*, 2002). A *psi*, les séquences accessoires sont adjacentes au site de fixation de XerC. Dans cette configuration, le premier échange de brin est catalysé par XerC. La jonction de Holliday est ensuite résolue par un second échange de brins catalysé par XerD (Figure 21) (Colloms et al., 1996). Si l'orientation du site core par rapport aux séquences accessoires est inversé alors l'ordre d'échange de brin est inversé et XerD active le premier échange de brin (Bregu et al., 2002). A *cer*, le premier échange de brin est catalysé par XerC. En conséquence de la taille de la région centrale de 8 pb, l'intermédiaire de jonction de Holliday est bloqué et s'accumule *in vitro* (Colloms et al., 1996). La jonction de Holliday n'est ni résolu par XerD, ni reconvertie en substrat par XerC. L'intermédiaire est cependant résolu *in vivo* par d'autres processus cellulaires (Figure 21) indépendant des résolvases de jonction de Holliday tel que RuvC (McCulloch *et al.*, 1994) ou RusA (Barre & Sherratt, 2005).

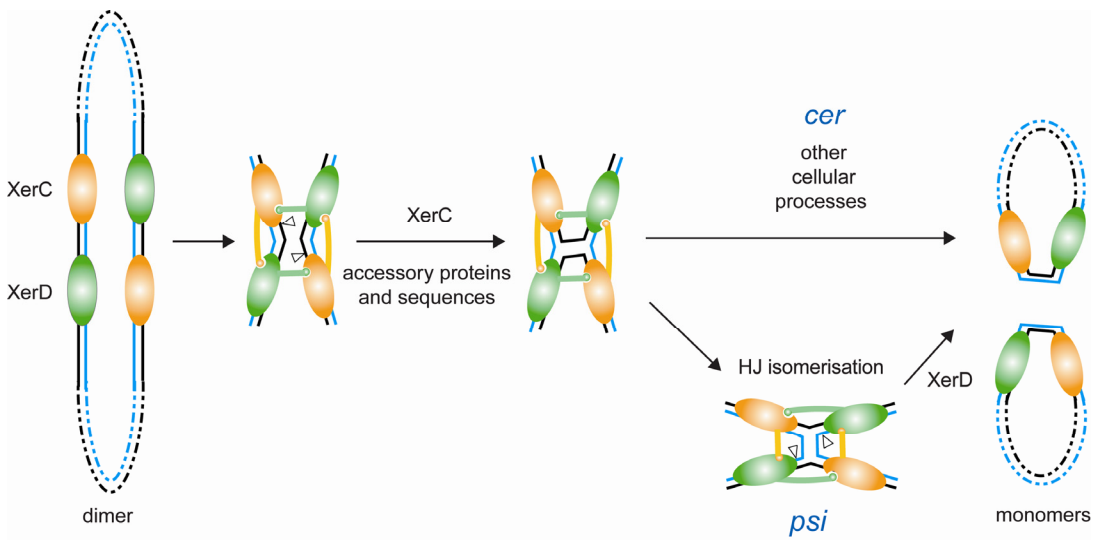


Figure 21. Voies catalytiques de recombinaison des recombinases XerC/D aux sites *cer* et *psi*

II.2.2. Résolution des dimères de chromosomes

II.2.2.1. Les dimères de chromosomes

La formation de dimères de chromosomes empêche la partition de l'information génétique dans les deux cellules filles. Ces dimères de chromosomes sont généralement le fruit de la recombinaison homologue. Barbara McClintock avait depuis longtemps conjecturé qu'un simple crossover entre chromatides sœurs de chromosomes circulaires pouvait générer des problèmes de dimérisation (McClintock, 1932). En effet, si le nombre de crossover formés entre chromosomes circulaires est impair alors les deux chromosomes deviennent covalemment liés en dimère à la fin de la réplication (Figure 22).

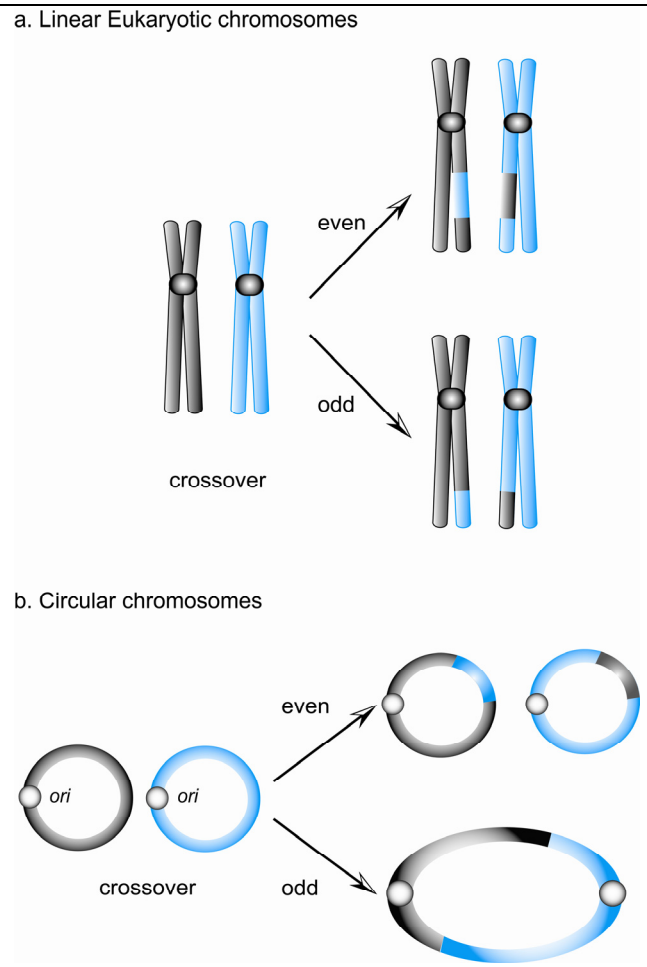


Figure 22. Schéma représentant les conséquences d'évènements de crossover entre des chromosomes (a) linéaires et (b) circulaires.

La recombinaison homologue peut être déclenchée pour la réparation d'une des deux chromatides sœurs derrière les fourches de réplication. Elle peut aussi intervenir au niveau des fourches. En effet, les protéines de recombinaison homologue dont RecA fait partie, sont des acteurs majeurs permettant le redémarrage des fourches de réplication. La recombinaison homologue fait intervenir un intermédiaire de réaction de jonction de Holliday dont la résolution par le complexe RuvABC peut mener à deux types de produits : crossover et non-crossover (Figure 23). Chez *E. coli*, la voie de résolution par RuvABC est biaisée et conduit plus souvent à des produits non-crossover que crossover (Cromie & Leach, 2000, Michel *et al.*, 2000).

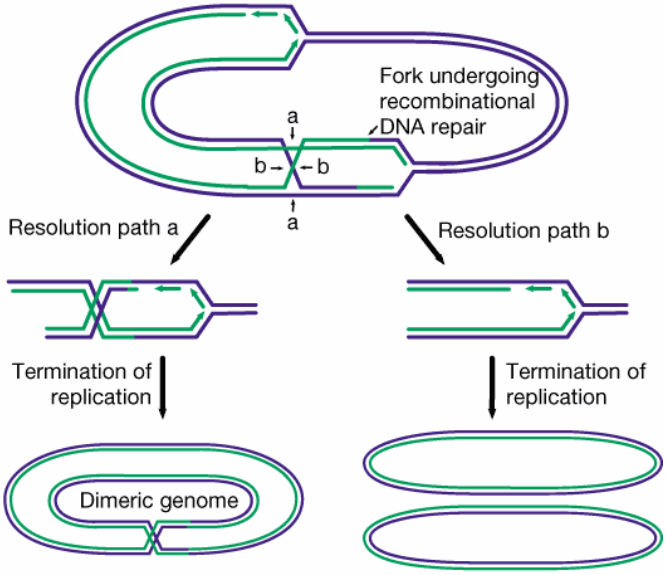


Figure 23. Résolution de la jonction de Holliday par RuvABC après réparation (Cox et al., 2000). La résolution de la jonction de Holliday peut mener à deux types de produits : crossover (a) et non-crossover (b). Un nombre impair de crossover conduira à la formation d'un dimère de chromosome qui sera résolu par le système Xer.

Chez *E. coli*, la résolution des dimères de chromosomes a lieu par recombinaison spécifique de site au niveau du site *dif*, positionné à 180 º de l'origine de réplication (Kuempel et al., 1991, Clerget, 1991). Le site *dif* est constitué d'un site core de 28 pb,

formé de deux sites de fixation des recombinases XerC/D de 11 pb séparés par une région centrale de 6 pb. L'ajout d'un crossover supplémentaire par les recombinases XerC/D à *dif* permet de résoudre le dimère en deux monomères équivalent (Figure 24).

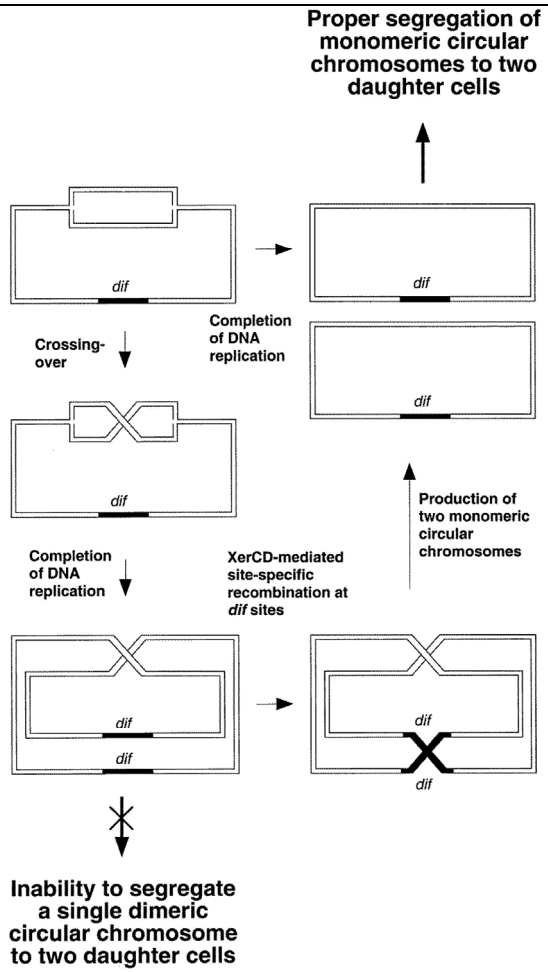


Figure 24. Les problèmes amenés par des réactions de crossover entre chromosome circulaire est résolu par addition d'un crossover additionnel au niveau du site dif par les recombinases XerC/D (Cromie & Leach, 2000).
Dans les mutants Xer, tous les dimères de chromosomes demeurent irrésolus après crossover et donnent lieu à des problèmes de ségrégation.

A l'inverse des dimères de plasmides, les dimères de chromosomes bactériens sont trop gros pour être séparés par des méthodes physiques comme l'électrophorèse en gel d'agarose. Cependant le taux de formation de dimères de chromosomes peut être estimé en utilisant différentes méthodes. La première méthode mise au point

consistait à détecter le taux d'évènements de recombinaison au site *dif* en séparant par centrifugation sur gradient de densité des molécules d'ADN marquées aux isotopes lourds (Steiner & Kuempel, 1998a). En utilisant cette méthode, le taux de recombinaison à *dif* a pu être quantifié chez *E. coli* à environ 15% par cellule par génération, ce qui revient à dire que 15% de dimères sont formés par cellule par génération. Perals et coll. ont mis au point un autre test basé sur la mesure de la recombinaison Xer à *dif* en mesurant la fréquence d'excision d'une cassette antibiotique placé entre deux sites *dif* en répétition directe sur le chromosome (Perals *et al.*, 2000). Lorsque la cassette est placée au locus de *dif*, le taux d'excision de la cassette est d'environ 12% par cellule par génération. Des mutants recombinogènes présentent un taux plus élevé d'évènements de recombinaisons à *dif* alors que l'inactivation de RecA quasi-annule le taux de recombinaison à *dif* (Steiner & Kuempel, 1998b, Perals *et al.*, 2001). Ces expériences permettent de démontrer le lien de cause à effet entre recombinaison homologue et formation des dimères de chromosomes.

L'inactivation du système Xer par délétion de *dif* ou de *xer*C, génère un phénotype caractéristique de filamentation d'une sous-population de cellules (Blakely et al., 1991, Kuempel et al., 1991). Les cellules inactivées pour la résolution des dimères de chromosomes ont un faible taux de croissance et un taux plus faible de formation de colonies (Cornet *et al.*, 1996) avec induction de la réponse SOS (Kuempel et al., 1991). Dans les cellules filamenteuses, l'observation des nucléoïdes au DAPI montre un net défaut de partition des chromosomes (Steiner & Kuempel, 1998a). L'inactivation de RecA supprime ce phénotype filamenteux. En l'absence d'un système de résolution de dimères de chromosomes, les dimères ne peuvent être ségrégés et restent piégés au milieu de la cellule. Malgré l'existence de mécanismes

agissant comme points de contrôle (Bernhardt & de Boer, 2005), le septum de division se ferme sur le dimères de chromosomes d'où le terme de 'guillotinage' des dimères (Hendricks *et al.*, 2000). Des dommages fait à l'ADN déclenchent la réponse SOS, ce qui induit, la filamentation des cellules (Hendricks et al., 2000). L'origine de ces dommages est encore inconnue. Chez *E. coli*, les mutants exhibant ce phénotype ont un profil caractéristique de croissance en microcolonies que l'on appelle 'twin filaments' (Figure 25) (Hendricks et al., 2000). Ce sont deux filaments contigus et de même taille qui sont le résultat du guillotinage d'un dimère de chromosome à la première division cellulaire.

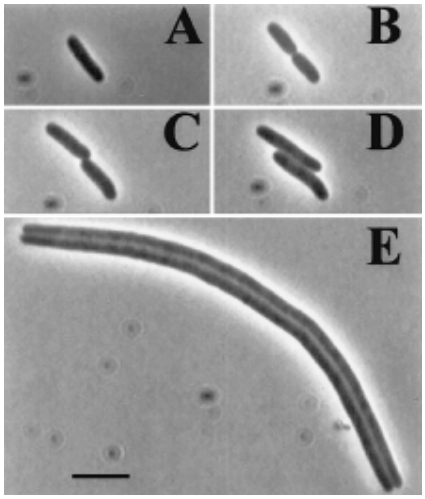


Figure 25. Formation de filaments jumeaux ('Twin filaments') formés par division et élongation de mutants de E. coli ne pouvant pas résoudre leurs dimères de chromosomes (Δ*dif-hip*A::*cat*, PK3946) (Hendricks et al., 2000). Les cellules vivantes sont étalées sur une lame de microscope recouverte de milieu agar. Les photos sont prises à intervalles durant la croissance des cellules à 37ºC. L'échelle indique 5 µm. (A) Cellule initiale (B) Après 15 min, (C) Après 30 min, (D) Après 45 min, (E) Après 120 min.

L'absence de résolution des dimères de chromosomes conduit inévitablement à la mort cellulaire. C'est sur cette dernière caractéristique que la méthode de mesure de viabilité par compétition de croissance a été basée pour déterminer le taux de formation de dimère. Ce test très sensible permet d'estimer avec une grande fiabilité

la différence de viabilité entre deux souches isogéniques sauf pour la présence d'un composant du système Xer. Ainsi chez *E. coli*, la délétion de *dif* provoque un défaut de croissance de 15% de cellules par génération par rapport à une souche sauvage. Ce taux de mortalité correspond au taux de 15% de dimères formés par cellule par génération.

Quelques recherches plus approfondie ont été réalisées pour déterminer quelle voie de recombinaison homologue est responsable de la formation des dimères de chromosomes. Elles montrent que l'inactivation de la voie RecBCD ou RecFOR entraine une chute égale du taux de recombinaison à *dif* (Steiner & Kuempel, 1998b, Perals et al., 2001). Les deux voies de recombinaisons RecBCD et RecFOR peuvent par conséquent produire des dimères de chromosomes quand l'une ou l'autre voie est inactivée (Steiner & Kuempel, 1998b, Perals *et al.*, 2001). Lorsque l'on inactive les deux voies, le pourcentage de recombinaison à *dif* est quasi inexistant comme dans un mutant *recA*. D'autres travaux montrent que lorsque l'on stimule indépendamment la voie RecFOR ou RecBCD dans un contexte où les deux voies sont actives, seule la voie RecBCD peut mener à la formation de dimères (Cromie & Leach, 2000). RecFOR ne mènerait pas à la formation de dimères à cause du biais de résolution de sa jonction de Holliday par RuvABC (Cromie & Leach, 2000). Dans un mutant recombinogène *rep*, l'ajout des deux mutations *dif* et *ruv* est létale. Dans cette souche, la mutation *rep* provoque plus d'évènements de recombinaison homologue, le biais de résolution de la jonction de Holliday n'est plus biaisé vers des évènements de non-crossover, par conséquent il y a une quantité létale de dimères formés qui ne sont pas résolus. Le triple mutant *rep*, *dif*, *ruv* est sauvé si la voie RecFOR est inactivée (Michel et al., 2000). En l'absence de RuvABC, les

évènements de recombinaison par RecFOR pourrait donc conduire à la formation de dimères.

II.2.2.2. Le contrôle de la recombinaison à dif par FtsK

A la différence des sites plasmidiques *cer* et *psi*, le site *dif* est constitué uniquement d'un site core et ne requiert pas de séquences accessoires (Tecklenburg *et al.*, 1995). La directionalité de la recombinaison à *dif* sur plasmides à haut nombre de copies n'est pas contrôlée et peut être soit intra- soit intermoléculaire (Blakely et al., 1991). Pourtant, son activité sur le chromosome est axée vers la résolution des dimères de chromosomes en monomères puisque dans un contexte *rec*A, il n'y a plus de recombinaison à *dif* (Perals et al., 2001, Steiner & Kuempel, 1998b). De plus la recombinaison à *dif* a lieu tard dans le cycle cellulaire et dépend impérativement de la division cellulaire (Steiner & Kuempel, 1998a). En effet le blocage de la division cellulaire par la céphalexine ou par une mutation *fts*Zts empêche la recombinaison à *dif* (Steiner & Kuempel, 1998a). Il avait donc été proposé que la directionalité de la recombinaison soit assurée par quelques aspects de la partition même des chromosomes. Par ailleurs, le contexte génomique du site *dif* est un facteur important dans sa fonctionnalité. Le remplacement de *dif* par des sites *dif* ectopiques montre que les sites sont fonctionnels uniquement lorsqu'ils sont localisés dans la région du terminus de réplication à environ 30 Kb entourant le locus *dif*, cette zone est appelée la DAZ pour '*dif* activity zone' (Leslie & Sherratt, 1995, Cornet et al., 1996, Kuempel *et al.*, 1996, Perals *et al.*, 2000). D'autre part, les réplichores sont polarisés de l'origine de réplication vers *dif* par des motifs nucléotidiques (Lobry & Louarn, 2003) et la position du site *dif* à la jonction de cette polarisation est indispensable à son

activité de recombinaison et de résolution des dimères de chromosomes (Corre *et al.*, 1997, Perals et al., 2000, Lesterlin *et al.*, 2005, Capiaux *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces arguments suggéraient que la recombinaison à *dif* sur le chromosome soit contrôlée. (1) La recombinaison à *dif* sur le chromosome est orientée vers la résolution des dimères de chromosomes en monomères (Steiner & Kuempel, 1998b, Perals et al., 2001). (2) La position du site *dif* à la jonction de polarisation des réplichores est indispensable à son activité de recombinaison et de résolution des dimères de chromosomes (Cornet et al., 1996, Perals et al., 2000, Corre et al., 1997, Kuempel et al., 1996, Lesterlin et al., 2005, Leslie & Sherratt, 1995), (3) La recombinaison à *dif* est dépendante de la division cellulaire (Steiner & Kuempel, 1998a). En fait il s'est avéré plus tard, que ce n'est pas la division cellulaire qui est en-soi requise pour la résolution des dimères de chromosomes mais l'action du domaine C-terminal de la protéine FtsK, protéine du septum de division (Steiner *et al.*, 1999).

La découverte du rôle de FtsK dans la résolution de dimères de chromosomes a permis de répondre aux nombreuses interrogations sur le contrôle directionnel de la recombinaison à *dif*. FtsK est une grosse protéine de 1329 aa, constituée d'un domaine amino-terminal et d'un domaine carboxy-terminal reliés par une région peu structurée, appelée 'linker'. FtsK est avant tout une protéine de la division cellulaire ancrée au septum de division par son domaine N-ter via quatre segments transmembranaires (Begg et al., 1995, Yu et al., 1998a).

Son domaine N-ter est essentiel et suffisant pour la division cellulaire, il jouerait un rôle de pivot central dans le recrutement des protéines précoces et tardives du septum de division. De plus le domaine N-ter joue un rôle d'ancre au septum du

domaine C-ter qui est impliqué dans la ségrégation des chromosomes (Barre *et al.*, 2000).

Le domaine linker de FtsK est peu conservé en séquence et en taille. Chez *E. coli*, le linker est un long segment d'environ 600 aa riche en proline et en acide glutamique (Begg et al., 1995) qui pourrait adopter une structure en 'coiled coils'. La présence du linker est nécessaire pour un correct fonctionnement du domaine C-ter de FtsK dans la résolution des dimères de chromosomes (Bigot *et al.*, 2004). Le linker pourrait avoir une participation active dans la formation de multimères de FtsK et/ou une interaction avec les autres protéines du divisome. Ses rôles respectifs dans la résolution des dimères de chromosomes et dans la division cellulaire sont en cours d'investigation au laboratoire (N. Dubarry, S. P. Kennedy).

Le domaine carboxy-terminal $FtsK_C$ est subdivisé en trois sous-domaines α, β et γ. $FtsK_C$ est impliqué dans la ségrégation des chromosomes (Liu et al., 1998, Yu *et al.*, 1998b) et plus particulièrement dans la résolution des dimères de chromosomes (Steiner et al., 1999). Bien que FtsK soit déjà ancrée à la membrane, l'activation de la recombinaison par FtsK est retardée et coïncide avec la fermeture du septum de division cellulaire (Figure 26) (Kennedy *et al.*, 2008, Steiner & Kuempel, 1998a).

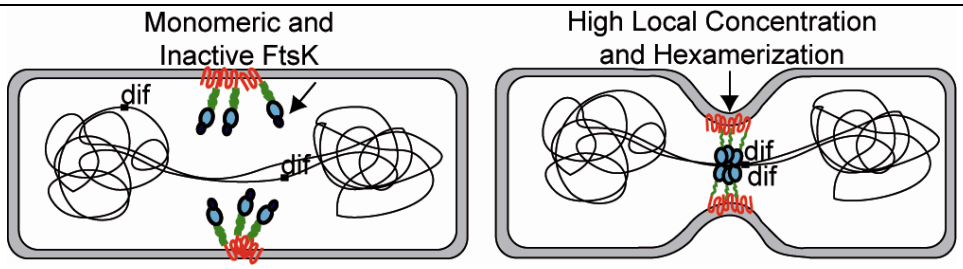


Figure 26. Modèle d'activation de $FtsK_C$ dans la ségrégation des chromosomes lors de la fermeture du septum de division (Kennedy et al., 2008).
Le contrôle de l'activité de FtsK dépend de sa concentration locale. Une augmentation de la concentration locale de FtsK dans le septum en cours de fermeture permet l'hexomérisation de l'activation de FtsK.

$FtsK_C$ active la recombinaison Xer par un contact local direct avec XerD (Aussel *et al.*, 2002). FtsK est capable d'imposer un remodelage du complexe synaptique de par son activation spécifique ATP-dépendante de XerD (Aussel et al., 2002, Massey et al., 2004). C'est le sous-domaine γ qui est responsable de l'interaction spécifique avec XerD (Figure 27) (Yates et al., 2003, Yates et al., 2006).

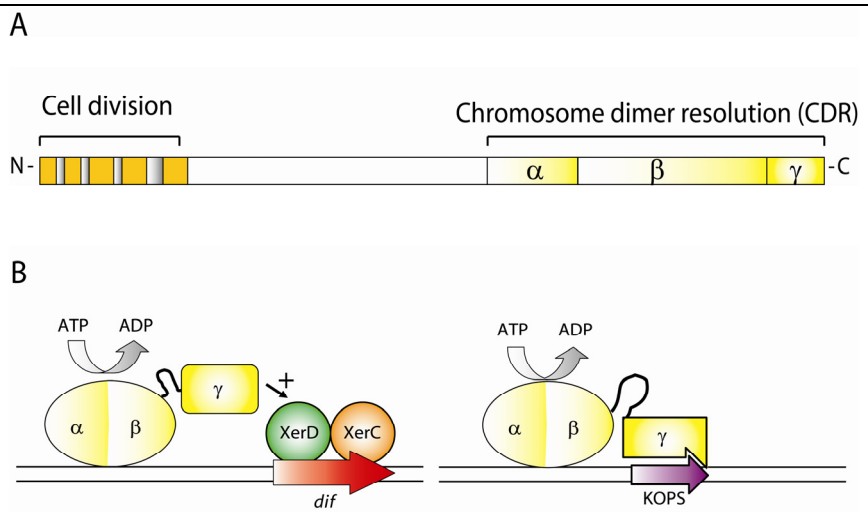


Figure 27. Organisation de la protéine FtsK en trois domaines (F.X. Barre).
(A) FtsK est composée d'un domaine N-ter essentiel dans la division cellulaire relié au domaine C-ter par une région Linker non structurée. Le domaine C-ter est impliqué dans la résolution de dimères de chromosomes via son activation de la recombinaison Xer et son activité de translocation de l'ADN.
(B) Représentations schématiques du domaine C-ter. Le domaine C-ter est subdivisé en trois sous-domaines α, β et γ. Les domaines α et β renferment l'activité de translocation de l'ADN en utilisant l'énergie d'hydrolyse de l'ATP. Le sous-domaine γ est impliqué dans l'activation spécifique directe de XerD et dans la reconnaissance des KOPS.

A *dif*, en présence de FtsK, XerD catalyse le premier échange de brin, puis XerC résout l'intermédiaire de jonction de Holliday (Figure 28 et Figure 17 - voie 2). Cette seconde étape est indépendante de FtsK (Aussel et al., 2002). L'ordre d'échange des brins à *dif* est donc opposé de celui observé à *cer* et à *psi* puisqu'à *cer* et à *psi*, en présence des facteurs accessoires, XerC catalyse le premier échange de brin. Il est intéressant toutefois de noter qu'en l'absence de FtsK, XerC est plus enclin à catalyser le premier échange de brin à *dif*, mais la jonction de Holliday formée est reconvertit en substrat par XerC (Figure 28 et Figure 17 - voie 1) (Barre *et al.*, 2000).

Une réaction complète de crossover nécessite donc la présence de FtsK qui modifie le complexe synaptique afin de l'amener vers une conformation permettant à XerD de catalyser le premier échange de brin (Aussel et al., 2002).

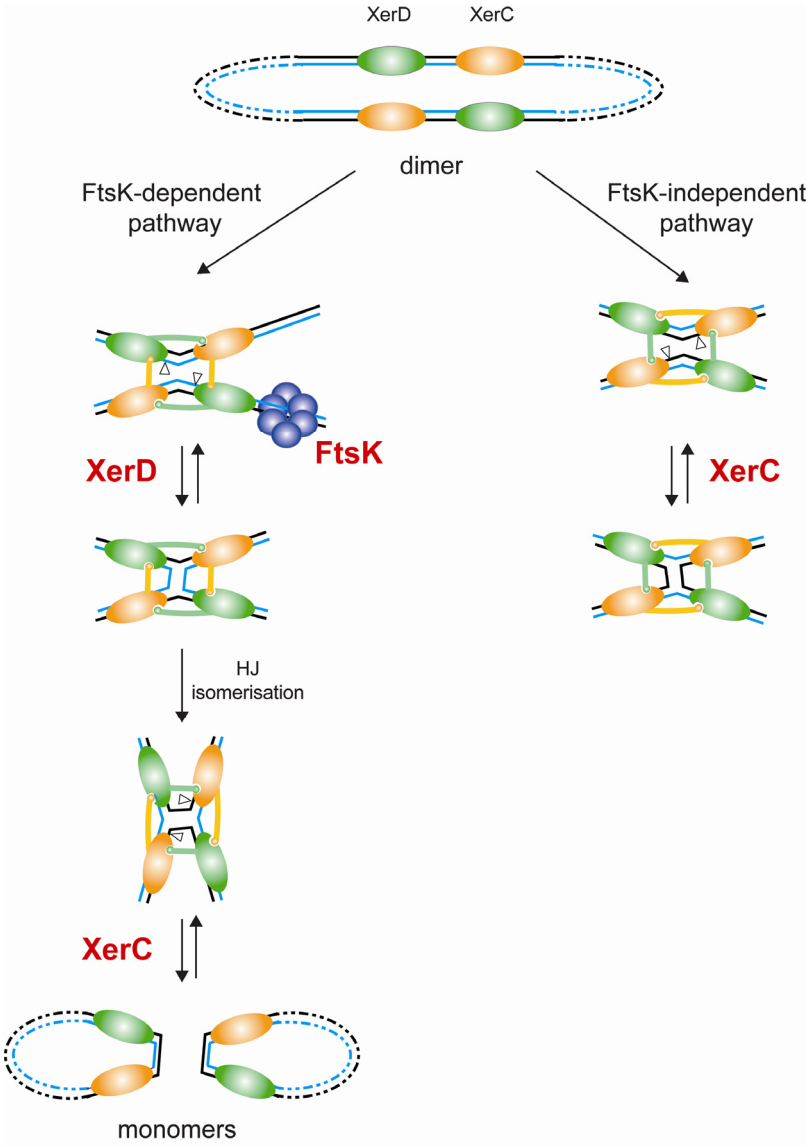


Figure 28. Voie de recombinaison Xer à *dif* dépendante et indépendante de FtsK
En l'absence de FtsK, le complexe synaptique adopte une conformation où XerC est plus favorisée pour cliver. La jonction de Holliday formée est reconvertit en substrat par XerC. FtsK utilise l'énergie d'hydrolyse de l'ATP pour activer XerD dans le complexe synaptique. Il y a alors formation d'une jonction de Holliday productive qui peut être résolue par XerC indépendamment de FtsK. XerC est représenté en gris clair et XerD en gris foncé. FtsK est représentée sous forme hexamérique. L'action de coupure de XerC et XerD est représentée par des triangles blancs et noirs respectivement.

L'expression du domaine carboxy-terminal de FtsK ($FtsK_C$) dépourvue de son attache membranaire montre une absence de localisation spécifique de la protéine qui est retrouvée diffuse dans le cytoplasme (Barre et al., 2000). Même dans les souches où le site *dif* se trouve à une position ectopique (en dehors de la DAZ), $FtsK_C$ permet d'activer la recombinaison à *dif*. Cependant elle ne permet pas de restaurer la capacité de résoudre les dimères de chromosomes (Barre et al., 2000). L'ancrage de FtsK au septum est donc nécessaire pour résoudre les dimères de chromosome (Barre et al., 2000, Perals et al., 2001).

FtsKc est une ADN translocase qui s'associe sous forme hexamèrique et qui utilise l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour transloquer l'ADN bicaténaire à une vitesse de ~ 6 kpb/sec (Saleh *et al.*, 2004, Pease *et al.*, 2005, Massey *et al.*, 2006). Les domaines α et β renferment le moteur de la protéine, ils contiennent des motifs de liaison à l'ATP pour une activité ADN translocase ATP-dépendante (Aussel et al., 2002, Saleh et al., 2004). FtsK appartient à la même famille que la protéine SpoIIIE de *Bacillus subtilis* qui est responsable du pompage de l'ADN dans la pré-spore lors de la sporulation. Les ADN translocases sont des moteurs moléculaires qui bougent le long de l'ADN quand elles sont libres et qui pompent l'ADN quand elles sont fixes. FtsK assure donc le pompage de l'ADN au travers du septum de division. Chez *E. coli*, quasi seuls les dimères de chromosomes sont recombinés par XerC/D et c'est l'accessibilité du dimère au septum par FtsK qui va permettre l'activation de la recombinaison (Perals et al., 2001, Kennedy et al., 2008b). Il a été montré qu'en substituant *dif* par *lox*P et en exprimant Cre, afin de s'affranchir du rôle d'activation de la recombinaison Xer par FtsK, la résolution des dimères de chromosomes nécessite toujours la présence de FtsKc (Capiaux *et al.*, 2002). Ainsi, il a été montré que FtsK assure le pompage de l'ADN des dimères de chromosome au travers du

septum de division pour permettre le rapprochement des sites *dif* (Bigot et al., 2004). La direction dans laquelle FtsK pompe l'ADN est polarisée (Levy et al., 2005, Bigot et al., 2005). Ce résultat a permis de comprendre pourquoi il est nécessaire que *dif* soit positionné à la jonction de polarité des deux réplichores pour être fonctionnel (Lesterlin et al., 2005). En fait c'est le sens de translocation de FtsK qui est dictée par de petites séquences chromosomique de 8 paires de bases, les KOPS (pour FtsK Orienting Polar Sequences) (Levy et al., 2005, Bigot et al., 2005) qui favorisent le chargement de FtsK dans une orientation donnée sur l'ADN (Bigot et al., 2006). Le sous-domaine γ est impliqué dans la reconnaissance spécifique des KOPS pour permettre le chargement orienté de la protéine sur l'ADN (Sivanathan *et al.*, 2006). Les KOPS sont réparties sur le chromosome d'*E. coli* en deux bras de polarité inverse, pointant de l'origine de réplication vers la région de terminaison de la réplication. Comme *dif* est situé à la jonction de polarité des réplichores et donc des KOPS, le pompage orienté de l'ADN permet de mettre en contact les deux sites *dif* portés par un dimère de chromosomes (Figure 29) (Bigot et al., 2006).

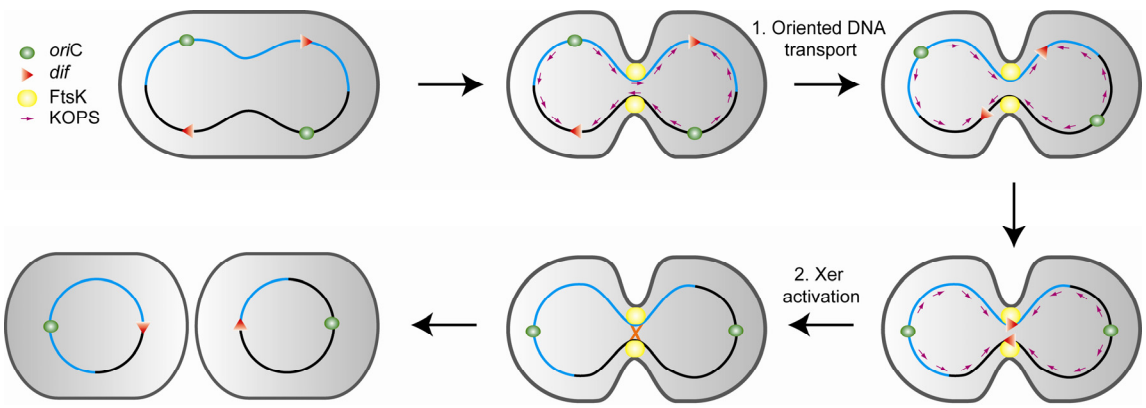


Figure 29. Modèle présentant la double fonction de la protéine FtsK dans la résolution des dimères de chromosomes.
FtsK est ancrée au septum de division par son domaine N-ter. Elle rencontre les dimères qui sont piégés au milieu de la cellule, (1) elle transloque l'ADN de manière orienté par les KOPS vers *dif* afin de rapprocher les deux sites *dif* puis (2) elle active directement la recombinaison Xer.

FtsK permet donc un contrôle directionnel de la résolution des dimères de chromosome de façon extrêmement sophistiqué. Elle exerce un contrôle temporel en coordonnant la résolution des dimères de chromosomes à la division cellulaire. Elle exerce un contrôle spatial en rapprochant les sites *dif* du dimère au septum et un contrôle structural par activation de la recombinaison Xer (Figure 30).

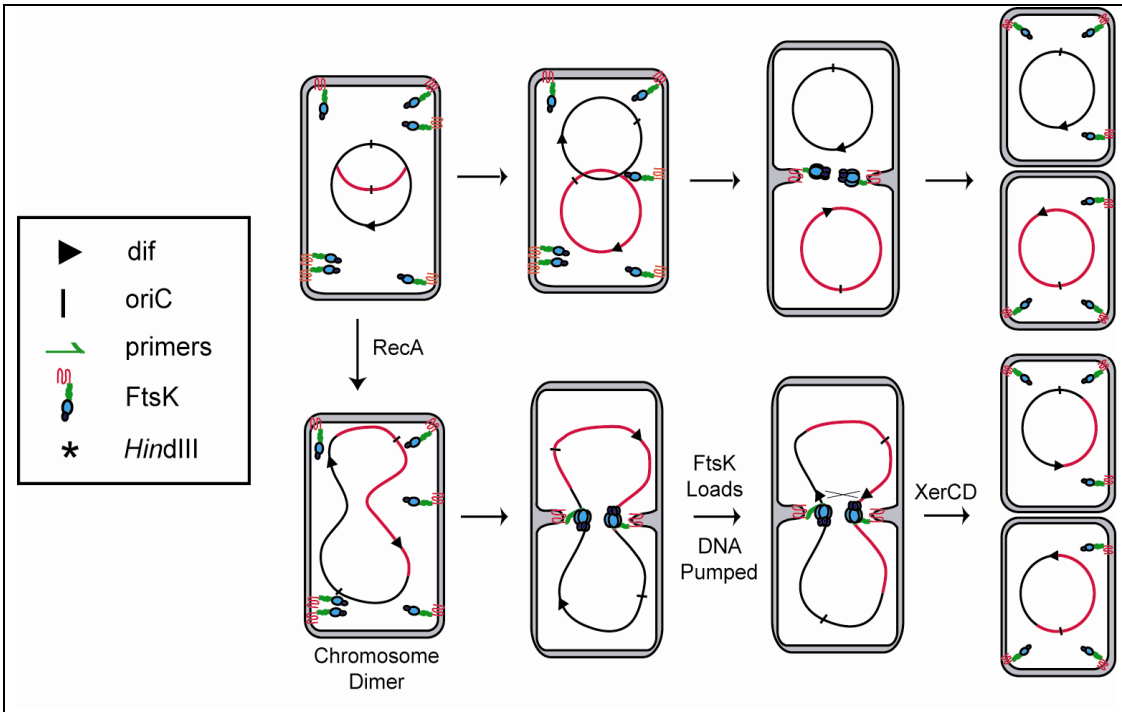


Figure 30. Modèle de contrôle directionnel, structural et temporel de la résolution des dimères de chromosomes chez E. coli (Kennedy et al., 2008).
En haut, schéma de cellules qui ne forment pas de dimères. En bas, mécanisme de gestion par le système Xer et la protéine FtsK d'un dimère. A la fermeture du septum, FtsK peut se charger sur le dimère piégé au septum. FtsK pompe alors l'ADN de manière orientée pour rapprocher les sites *dif* puis active la recombinaison Xer.

II.2.3. Décaténation des chromosomes

Les Topoisomérases sont des enzymes qui convertissent différents états topologiques de l'ADN. Elles contrebalancent les perturbations topologiques générées par les mécanismes de maintenance de l'ADN. Elles sont classées en deux catégories, type I et II, selon si elles clivent respectivement un ou deux brins de

l'ADN. Chez *E. coli*, il existe deux topoisomérases de type II, la Gyrase et la TopoIV qui permettent le relâchement des supertours positifs et négatifs de l'ADN et la caténation/décaténation de molécules d'ADN circulaire. Lors de l'avancée de la fourche de réplication, des super-tours positifs s'accumulent devant la fourche. La gyrase agit principalement dans le relâchement de ces super-tours (+). Il peut arriver que les super-tours (+) ne soient pas tous relâchés et qu'ils diffusent derrière la fourche de réplication, par enroulement des doubles hélices répliquées l'une autour de l'autre (Figure 31). Il y a alors formation de pré-caténats qui deviendront des caténats lorsque la réplication sera terminée (pour revue (Postow *et al.*, 2001).

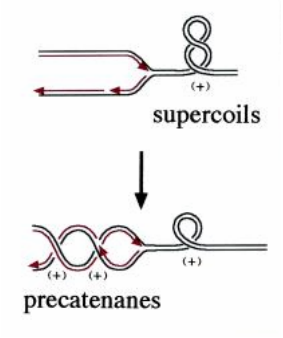


Figure 31. Formation de précaténats par enroulement des doubles hélices répliquées l'une autour de l'autre. Figure adaptée de (Postow et al., 2001).

L'absence de résolution des liens d'intercaténations empêche la partition des chromosomes. Chez *E. coli*, la TopoIV qui est un hétéro-tétramère de deux protéines ParC et ParE, résout les pré-caténats et les caténats à la fin de la réplication (Espeli & Marians, 2004). Son activité est régulée spatio-temporellement : elle est activée à la fin du cycle de réplication à proximité du septum de division (Espeli *et al.*, 2003b). Il a été montré que TopoIV a un site de coupure préférentiel à *dif* (Hojgaard *et al.*, 1999) et semblerait interagir avec FtsK pour stimuler la décaténation (Espeli *et al.*, 2003a). En effet chez *E. coli*, TopoIV, FtsK, *dif* et la machinerie de réplication semble être associées au centre de la cellule durant les étapes finales de la réplication (Espeli & Marians, 2004). La décaténation semble donc être coordonnée

spatialement et temporellement avec la résolution des dimères de chromosomes qui elle-même est coordonnée à la division cellulaire (Figure 32).

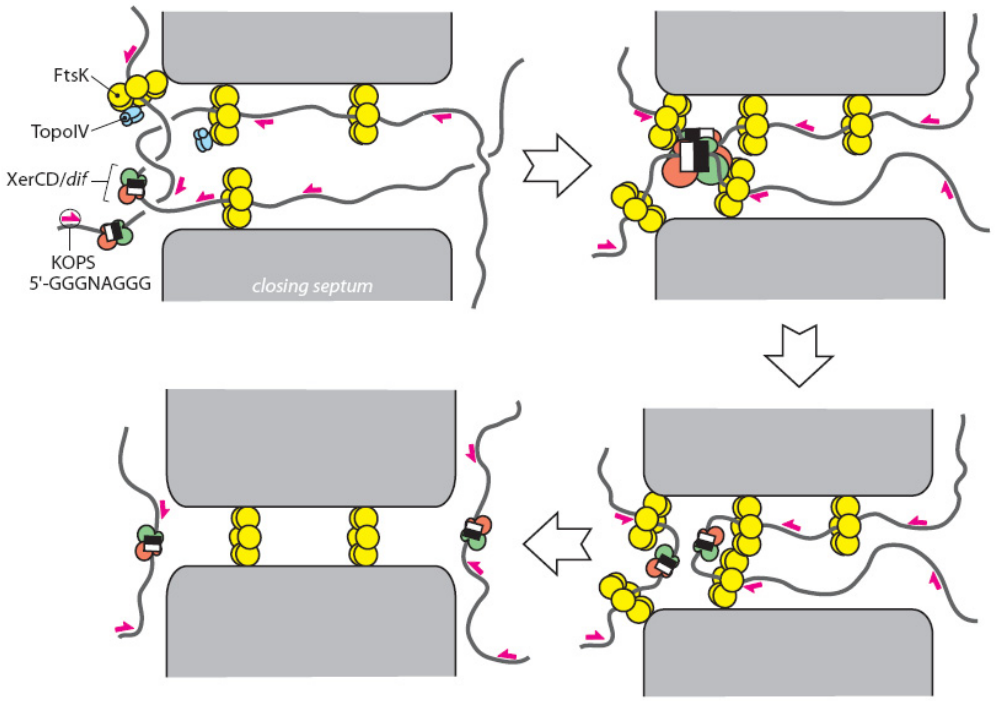


Figure 32. Modèle de ségrégation de la région du terminus de réplication durant la résolution des dimères de chromosomes (Bigot *et al.*, 2007).
Le schéma représente le milieu d'une cellule en cours de division. Les hexamères de $FtsK_C$ (jaune) associés au septum en cours de fermeture (gris), TopoIV (bleu), le complexe XerCD/*dif* (orange et vert) et quelques séquences KOPS (rose) sont indiqués. Seul le domaine $FtsK_C$ de FtsK est représenté en tant qu'hexamères. Le rôle des domaines N-ter et linker de FtsK sont symbolisés par l'interaction de $FtsK_C$ avec la membrane septale. En haut à gauche, les chromosomes frères sont dimériques et intercaténés et l'ADN chromosomique se retrouve étendu au travers du septum. FtsK se charge sur l'ADN de manière orientée en reconnaissance les KOPS, puis transloque l'ADN vers le complexe pré-assemblé hétéro-dimérique XerCD/*dif*. Ce processus de translocation aide à la compartimentalisation des chromosomes frères de chaque coté du septum et aide à la décaténation par TopoIV. En haut à droite, FtsK atteint le complexe XerCD/*dif* et contact XerD pour activer la recombinaison. En bas à droite, le dimère est résolu et FtsK fini de trier les chromosomes frères, permettant au septum de se fermer sans provoquer de dommages à l'ADN (en bas à gauche).

Par ailleurs, plusieurs cycles de recombinaison spécifique à *dif* peuvent résoudre les liens d'intercaténation indépendamment de l'activité de TopoIV (Grainge et al., 2007, Ip et al., 2003). L'excision d'une cassette chromosomique comportant deux sites *dif* en répétition directe est majoritairement dépendante de la formation de dimère de chromosomes puisque lorsqu'on inactive RecA, le taux d'excision chute à environ 1% (Kennedy et al., 2008, Perals et al., 2001). Ce taux de 1% pourrait représenter la part

du système Xer dans la décaténation terminale des chromosomes. En conclusion, ces travaux suggèrent que FtsK agit pour simplifier la topologie des chromosomes en même temps que la recombinaison Xer convertit les formes caténées et dimériques des chromosomes (Figure 33).

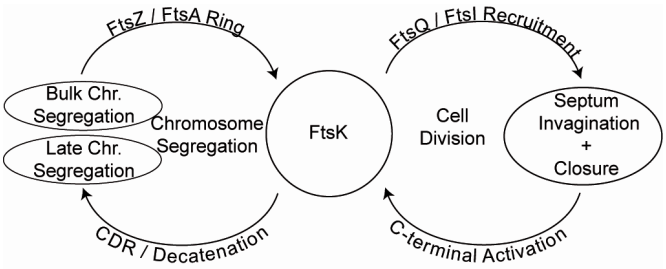


Figure 33. Intégration de la ségrégation des chromosomes et de la division cellulaire par la protéine FtsK (CDR = chromosome dimer resolution) (Kennedy et al., 2008).

II.2.4. Acquisition horizontale de gènes à dif

La machinerie XerCD est parfois détournée de sa fonction cellulaire par des éléments exogènes dans le but de catalyser leur intégration dans le chromosome de l'hôte au niveau du site *dif*. C'est le cas du phage CTX qui catalyse l'intégration de son génome simple brin au niveau du site *dif* du chromosome de *V. cholerae* en détournant les recombinases XerC et XerD de l'hôte (Huber & Waldor, 2002). Le site *att*P d'intégration du virus est constitué de séquences «palindromiques», lui permettant d'adopter une structure secondaire d'ADN double brin qui devient un substrat actif des recombinases XerCD (Val *et al.*, 2005). Tout comme pour la recombinaison à *cer* du plasmide ColE1, seule l'activité catalytique de XerC est nécessaire et fait le premier échange de brins. L'intermédiaire de réaction de jonction de Holliday est alors résolu par des facteurs cellulaires indépendants de XerD. L'intégration de CTXφ par le système Xer n'est pas un cas isolé, il apparait que d'autres éléments acquis horizontalement ont des cicatrices d'intégration qui

suggèrent qu'ils se sont intégrés à *dif* (Campos et al., 2003, Hamilton et al., 2005, Gonzalez et al., 2002).

II.3. Le système Xer, un système très régulé

Chez *E. coli*, les même recombinases XerC et XerD catalysent la résolution des multimères des plasmides pSC101, ColE1, et la résolution des dimères de chromosomes. Nous avons vu que sur trois sites distincts *dif*, *cer* et *psi* (Tableau 1), les voies de recombinaison empruntées par les recombinases Xer et les produits finaux de recombinaison sont différents. Le mécanisme de recombinaison est influencé par le site de recombinaison, les facteurs accessoires et la topologie du substrat.

Site	Site de XerC	RC	Site de XerD
E. coli dif	GGTGCGCATAA	TGTATA	TTATGTTAAAT
pSC101 *psi*	GGTGCGCGCAA	GATCCA	TTATGTTAAAC
colE1 *cer*	GGTGCGTACAA	TTAAGGGA	TTATGGTAAAT
dif8	GGTGCGCATAA	TTTGTATA	TTATGTTAAAT
dib	GGTGCGCATAA	TCTCTA	TTATGTTAAAT
cer3	GGTGCGTACAA	CGGGAG	TTATGTTAAAT
cer6	GGTGCGTACAA	GGGATG	TTATGTTAAAT

Tableau 1. Séquence des sites de recombinaison Xer

La taille de la région centrale influence fortement la stabilité de la synapse et l'exigence de facteurs accessoires pour activer la recombinaison. Des tests de recombinaisons ont été faits sur des sites synthétiques *dif8* (*dif* avec une région centrale de 8 pb). La recombinaison à *dif8* acquiert les mêmes exigences que la recombinaison à *cer* avec le besoin de facteurs accessoires pour activer la recombinaison (Sherratt *et al.*, 1995). *dif* peut recombiner de manière intra et intermoléculaire sur plasmide à haut nombre de copie, tandis que la recombinaison à

dif8 présente une sélectivité de résolution sur plasmides du fait des facteurs accessoires. La recombinaison à *cer6* (*cer* avec une région centrale de 6 pb) peut être affranchie des facteurs accessoires comme la recombinaison à *dif* (Sherratt *et al.*, 1995). L'affinité des recombinases Xer pour les substrats *dif*8 et *cer*6 est également intervertie par rapport à *dif* et *cer*. Bien que séparément la fixation des recombinases sur leur site de fixation à *dif* et *dif*8 soit identique, on observe une nette diminution de leur coopérativité de fixation à *dif*8 (Blakely & Sherratt, 1996). L'addition de 2 pb entre les sites de fixation de recombinase empêche les recombinases de se contacter correctement, ce qui déstabilise la synapse d'où la nécessité de facteurs accessoires. Dès lors, la directionalité de la recombinaison est contrôlée par l'architecture imposée de la synapse.

En plus de la taille, la séquence nucléotidique de la région centrale semble être décisive dans l'aptitude des recombinases à cliver. La jonction de Holliday peut adopter deux types de configuration, soit le brin Top traverse la jonction de Holliday soit le brin Bottom traverse la jonction ('crossing strands'). Les recombinases XerC et XerD préfèrent résoudre la jonction de Holliday au niveau des brins traversant la jonction de Holliday (Arciszewska et al., 1997). Par conséquent, selon la conformation de la jonction de Holliday, l'une ou l'autre paire de recombinases sera favorisée pour cliver. La préférence conformationnelle de l'intermédiaire de jonction de Holliday est influencée par la nature des bases de la région centrale. Chez les recombinases à tyrosine c'est le milieu de la région centrale qui semble influencer la conformation de la jonction de Holliday (Arciszewska et al., 1997, Gopaul et al., 1998). Il a été observé que les brins possédant un rapport plus élevé en purine ont une préférence à traverser la jonction de Holliday (Azaro & Landy, 1997). La

composition en nucléotide de la région centrale des sites *psi*, *cer* et *dif* aurait donc un impact sur la conformation de la jonction de Holliday et conduirait à différentes voies de résolution par les recombinases XerC/D. *In vitro* sur des substrats synthétiques de jonction de Holliday, une jonction de Holliday contenant le site *dif* est efficacement résolue par XerC mais aucun produit détectable de résolution par XerD n'est observé (Hallet et al., 1999). Par contre, dans une jonction de Holliday contenant le site core *psi*, on observe un faible taux de recombinaison par XerD. Lorsque la région centrale du site *dif* est remplacée par la région centrale du site *psi*, on observe également un faible taux de résolution de la jonction de Holliday par XerD (Hallet et al., 1999).

Les séquences de fixation des recombinases peuvent aussi déterminer la recombinaison (Blake *et al.*, 1997). Une diminution de l'affinité des recombinases pour leurs sites de fixation, comme à *psi*, requiert la présence de facteurs accessoires qui vont diriger la recombinaison vers des évènements intramoléculaire (Sherratt et al., 1995, Blake *et al.*, 1997).

La recombinaison à *dif* sur plasmide est dépendante de la protéine accessoire FtsK (Recchia *et al.*, 1999). Les sites core synthétiques *cer*3, *cer*6 et *dib* dont la composition nucléotidique de la région centrale de 6 pb a été modifiée (Recchia et al., 1999, Capiaux et al., 2002) peuvent recombiner sur plasmide indépendamment de facteurs accessoires tels que PepA ou FtsK.

De manière surprenante sur chromosome *cer*tains sites n'ont pas les mêmes capacités recombinationelles que sur plasmide. Lorsque placé sur le chromosome à la place du locus de *dif*, le site core de *psi* permet de résoudre les dimères de chromosomes (Cornet et al., 1994) alors que la recombinaison sur plasmide à *psi*

nécessite la présence de séquences accessoires. A l'opposé, *cer*6 ne recombine plus quand placé sur le chromosome, par contre *cer*3 dont seule la région centrale diffère de *cer*6 conserve sa capacité recombitionnelle sur chromosome (Capiaux et al., 2002).

Pour conclure, nous avons vu que la recombinaison spécifique de site Xer arbore des particularités qui la distingue des autres membres bien caractérisés de la même famille de recombinases à tyrosine : (1) Elle utilise deux recombinases différentes, (2) la réaction de recombinaison varie et présente des exigences distinctes selon si elle a lieu sur des sites plasmidiques ou chromosomiques, (3) malgré la divergence en séquence de la famille des recombinases à tyrosine, la séquence des recombinases Xer est conservée sur les chromosomes de la plupart des bactéries, ce qui suggère qu'il y a une forte contrainte exercée sur la manière dont la recombinaison Xer fonctionne dans la ségrégation des chromosomes.

III. *VIBRIO CHOLERAE* : UN NOUVEAU MODELE POUR L'ETUDE DU SYSTEME DE RESOLUTION DES DIMERES

III.1. *Vibrio cholerae*, l'agent pathogène du choléra

V. cholerae appartient à la famille des *Vibrionaceae*, du genre des γ-protéobactéries. Les *Vibrionaceae* sont des bactéries ubiquitaires retrouvées principalement dans les milieux marins et estuariens et peuvent être des pathogènes opportunistes. D'un point de vue clinique, *V. cholerae* est un représentant important de la famille des *Vibrionaceae*, puisqu'il est l'agent étiologique du choléra. *V. cholerae* est retrouvée particulièrement dans les eaux saumâtres des estuaires, les lits des fleuves et au contact du zooplancton, des algues marines et des plantes aquatiques.

III.1.1. Le choléra

Le choléra est une maladie strictement humaine entrainant des diarrhées aiguës et des vomissements engendrant une déshydratation du malade pouvant conduire à sa mort. Le choléra est à l'origine d'épidémies[1] et est transmis à l'Homme à travers la consommation d'eau ou de nourriture contaminée par *V. cholerae*. L'infection par *V. cholerae* est souvent asymptomatique (90% des cas), avec élimination des bactéries dans les selles pendant plusieurs jours, ce qui favorise les épidémies. Le spectre de la maladie va de la diarrhée banale (10% des sujets infectés) au choléra sévère (1% des sujets infectés). Son traitement est basé sur la réhydratation rapide des malades et les vaccins existant à l'heure actuelle sont des vibrions vivant atténués que l'on prend par voie orale. L'histoire a connu sept grandes pandémies[2] de choléra. La septième a commencé en 1961 et sévit encore aujourd'hui. Depuis le début du 21ème

[1] désigne l'apparition, le développement ou la propagation rapide d'une maladie infectieuse aux effets significatifs, le plus souvent par contagion, augmentant l'incidence de la maladie au sein d'une population par rapport à la normale.
[2] Désigne une épidémie qui s'étend à la quasi-totalité d'une population d'un ou de plusieurs continents, voire dans certains cas de la planète.

siècle, le choléra a infecté environ 300 000 personnes par an dans le monde; à peu près 10 000 en sont morts.

III.1.2. L'acquisition horizontale des gènes de virulence

Le choléra est un exemple de la dynamique d'adaptation d'un agent pathogène à son hôte en fonction de l'environnement, de la résistance naturelle et du comportement des populations qu'il infecte (Karaolis et al., 2001). La virulence et le caractère épidémique des souches pathogènes proviendraient de l'acquisition séquentielle de gènes de virulence tel que des gènes codant pour des toxines ou des facteurs de colonisation (Waldor & Mekalanos, 1996, Lin et al., 1999, Karaolis et al., 1998, Karaolis et al., 1999, Heilpern & Waldor, 2000). L'espèce *V. cholerae* contient 139 sérovars[3] dont seulement deux (O1 et O139) sont pathogènes et codent pour les agents majeurs de virulence du choléra, TCP (toxin coregulated pilus) et CT (cholera toxin). Les gènes de la toxine cholérique sont codés par un bactériophage CTXφ qui est intégré dans le chromosome de *V. cholerae* (Waldor & Mekalanos, 1996). Différents écotypes[4] existent au sein de l'espèce des *V. cholerae*, les sérovars O1 et O139 semblent particulièrement bien adaptées à l'intestin humain. Le sérovar O1 comprend les biovars[5] 'classique' responsable des six premières pandémies et 'El Tor' responsable de la septième pandémie. En 1992, une nouvelle souche inconnue jusque-là fut responsable d'une grave propagation du choléra en Inde et au Bangladesh. Cette souche est apparentée au biovar El Tor et présente un nouveau

[3] Variant au sein d'une même espèce bactérienne dont les caractères antigéniques permettent de l'individualiser des autres souches.
[4] Sous-population d'une espèce donnée qui a du développer des aptitudes nouvelles pour s'adapter à un type de station nouveau pour l'espèce.
[5] Variant au sein d'une même espèce bactérienne dont les caractères physiologiques et/ou biochimiques permettent de l'individualiser des autres souches.

sérovar dit O139. On peut redouter que cette nouvelle souche, implantée à l'état endémique [6] en Inde et au Bangladesh soit à l'origine d'une 8ème pandémie.

III.1.3. Le phage CTXφ

CTXφ est un bactériophage filamenteux (pour revue (Waldor & Friedman, 2005, Davis & Waldor, 2003)). Comme les autres virus de cette famille, il possède un génome circulaire simple brin, appelé aussi brin (+). Après adsorption à la surface de son hôte via le pili TCP, il libère son génome dans le cytoplasme de la bactérie (Figure 34). Le brin complémentaire au brin (+) est synthétisé par la machinerie cellulaire. Le génome double brin résultant est la forme réplicative du phage, appelée pCTX. L'expression des gènes phagiques se fait à partir de la forme réplicative. La synthèse de nouveaux brins (+) se fait par une réplication sous forme de cercle roulant. Cette synthèse est initiée en un locus précis de la forme réplicative, appelé *ori+* (Moyer et al., 2001) par une protéine phagique RstA. Les brins (+) néosynthétisés peuvent être empaquetés par les protéines de capside virale pour former des particules de phages qui sont alors sécrétées hors de la cellule. Ils peuvent aussi être convertis en nouvelles formes réplicatives.

D'autre part, CTXφ est capable de s'intégrer de façon irréversible dans le génome de son hôte (Figure 34) (Waldor & Mekalanos, 1996). CTXφ s'intègre au niveau du site *dif* de résolution des dimères de chromosomes en détournant les recombinases XerC/D de son hôte (Huber & Waldor, 2002). Selon la souche, CTXφ est retrouvé intégré au site *dif*1 du grand chromosome et/ou au site *dif*2 du petit chromosome (Figure 36).

[6] Désigne la présence habituelle d'une maladie dans une région déterminée. Dans l'ordre d'importance du nombre de personnes infectées il y a l'endémie, l'épidémie et la pandémie. Une endémie peut se développer en épidémie si les conditions environnementales le permettent. Par la suite une épidémie évolue toujours en pandémie ou régresse en endémie, la maladie pouvant éventuellement disparaître à la fin.

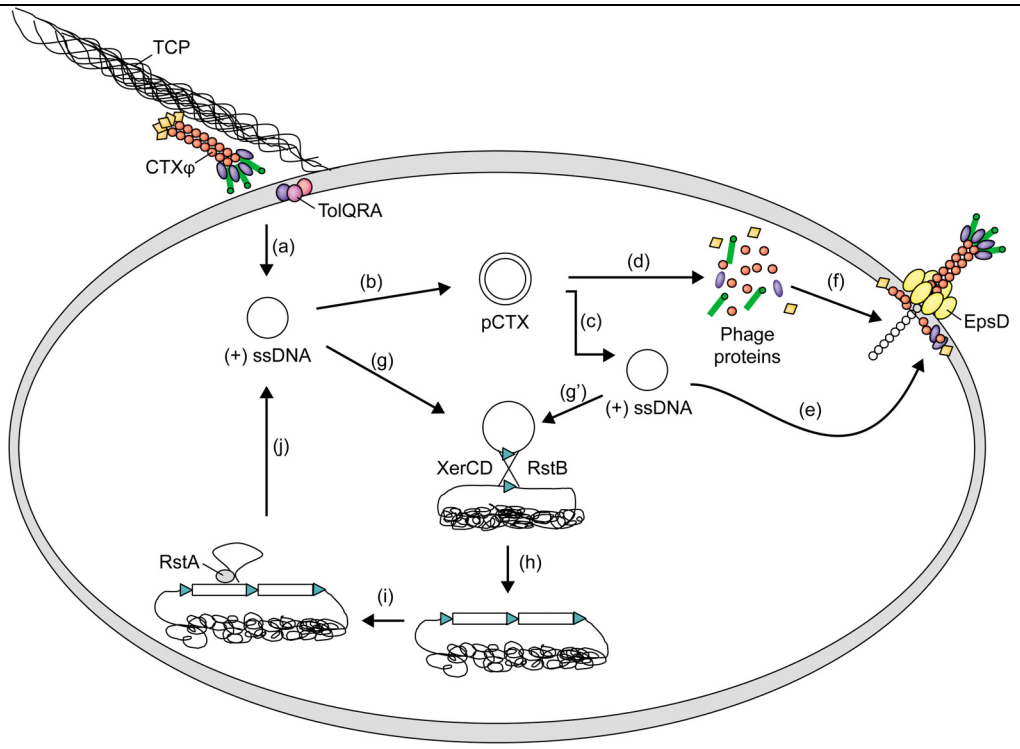


Figure 34. Modèle représentant les étapes clefs du cycle de vie du phage CTXφ (infection, integration, réplication, assemblage du virion et sécrétion).
Schéma adapté de (Davis & Waldor, 2003).
L'infection par CTXφ de *V. cholerae* requiert les pilis et récepteurs TCP et TolQ,R,A. Le génome simple brin (+) ssDNA de CTXφ perd ses protéines de capsides et est transféré dans le cytoplasme bactérien (a). L'ADN complémentaire du brin (+) est synthétisé pour générer pCTX, la forme réplicative double brin de CTXφ (b). La forme réplicative sert à la synthèse de nouveaux génomes simple brin (c) et permet la production des protéines phagiques (d). Les nouveaux génomes simple brin et les protéines phagiques peuvent servir à l'assemblage de nouveaux virions qui sont simultanément sécrétés à l'extérieur de la cellule par le système EpsD (e, f). La forme simple brin (+) peut également être intégrée directement au site *dif* du chromosome grâce aux recombinases XerC et XerD de l'hôte et à la protéine phagique RstB (g, g'). CTXφ peut être intégré seul ou en tandem avec d'autres prophages RS1 (h). Cet arrangement en tandem sert de matrice pour la production d'ADN extra-chromosomique (i). Ce processus est initié par la protéine phagique RstA. Il en résulte la formation de nouveaux génomes phagiques simple brin (+) ssDNA (j).

Lors de ma thèse, je me suis attachée à identifier les déterminants nucléiques, les activités biochimiques requises et le mode de régulation de la réaction d'intégration du phage CTXφ. Les détails de ces travaux sont exposés dans la présentation de l'article « The Single-Stranded Genome of Phage CTX Is the Form Used for Integration into the Genome of *Vibrio cholerae* » (Val, M. E., M. Bouvier, J. Campos, D. Sherratt, F. Cornet, D. Mazel & F. X. Barre, (2005) *Mol Cell* **19**: 559-566).

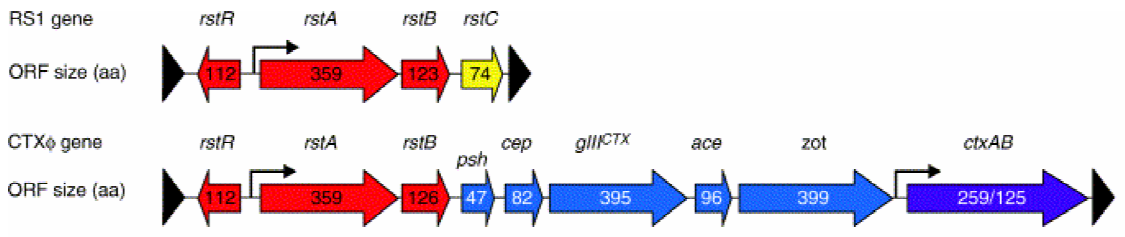


Figure 35. Organisation génétique des phages filamenteux RS1 et CTXφ intégré dans le chromosome de V. cholerae (Davis & Waldor, 2003).
Les flèches indiquent la direction de transcription des gènes. Les fléches noires repliées au-dessus représentent les promoteurs des gènes. Les triangles noirs représentent des séquences répétées encadrant les prophages. Trois gènes du phage RS1 sur quatre sont quasi-identiques aux gènes du phage CTXφ (flèches rouges). L'ensemble des gènes rstR, rstA et rstB du phage CTXφ sont appelés RS2. RstA est la protéine d'initiation de la réplication par cercle roulant, RstB semble être impliqué dans l'intégration du génome phagique, RstR est un répresseur transcriptionnel. Les gènes colorés en bleu dans CTXφ sont impliqués dans l'encapsidage, la sécrétion et la virulence du phage. Les gènes *ctx*A et *ctx*B codent pour les deux sous-unités de la toxine cholérique.Le gène rstC (RS1 - jaune) code pour un antirépresseur du répresseur RstR.

Le génome du phage CTXφ est subdivisé en 3 groupes (Figure 35) : (1) les gènes impliqués dans la réplication, l'intégration et la régulation de l'expression des gènes phagiques. (2) les gènes impliqués dans la morphogenèse du phage (protéines de capsides, sécrétion…) et (3) les gènes *ctx*A et *ctx*B codant pour les sous unités de la toxine cholérique. Le génome du phage contient aussi deux zones intergéniques (Ig-1 et Ig-2). Ig-1 contient le site *att*P d'intégration du phage (McLeod & Waldor, 2004, Val et al., 2005) ainsi que l'origine de réplication *ori*+, où la synthèse du brin (+) est réalisée par un mécanisme de cercle roulant (Moyer et al., 2001). Ig-2 possède des séquences promotrices ainsi que des séquences régulatrices (Kimsey & Waldor, 2004, Quinones et al., 2005).

Les souches contemporaines O139 et O1 - El Tor, responsables des dernières grandes épidémies de choléra, sont plus virulentes que la souche désormais disparue O1 - classique. Dans ces nouvelles souches, le prophage CTX a été trouvé intégré en tandem ou adjacent à un phage satellite, RS1 (Nandi *et al.*, 2003). RS1 possède tous les gènes constituant le core de CTX ainsi qu'un gène additionnel appelé *rst*C (Figure 36) (Davis et al., 2000, Davis & Waldor, 2000).

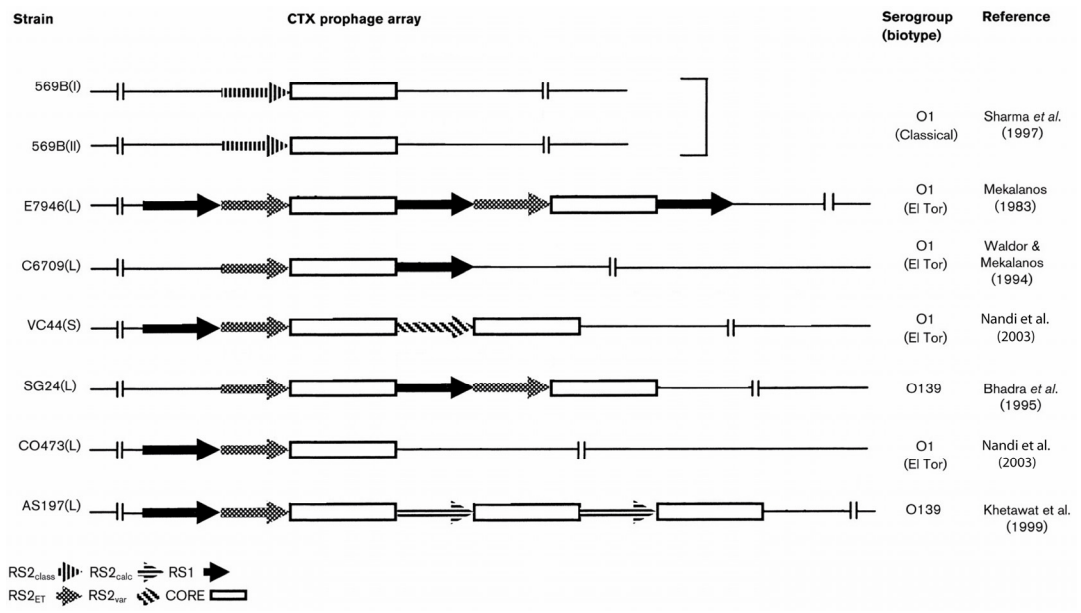


Figure 36. Comparaison de l'organisation des prophages CTX et RS1 dans diverses souches pathogènes de V. cholerae appartenant à divers sérovars et biovars (O1-classique, O1-El Tor, O139) (Nandi *et al.*, 2003).
Les lignes fines représentent l'ADN chromosomique. La présence du prophage dans le grand ou le petit chromosome est indiqué entre parenthèses (L) pour Large et (S) pour Small. CTXφ est composé d'un élément RS2 et d'un élément CORE. Il existe plusieurs types d'éléments RS2, qui diffèrent principalement par la séquence du gène *rst*R (class, calc, ET, var).

Cet arrangement pourrait être à l'origine de l'augmentation de la virulence des souches contemporaines par rapport au sérovar classique (Basu *et al.*, 1998, Davis et al., 2000). En effet, cet arrangement permet la production par réplication d'une forme extra-chromosomique réplicative pCTX (Figure 37) (Moyer et al., 2001) qui assure la transmission horizontale des virions tout en maintenant une copie chromosomique dans la souche donneuse (Davis & Waldor, 2000). D'autre part, le phage satellite RS1 code pour une protéine RstC qui déréprime l'expression des gènes de CTXφ, ce qui facilite la transmission horizontale du phage et augmente l'expression de la toxine cholérique (Davis *et al.*, 2002).

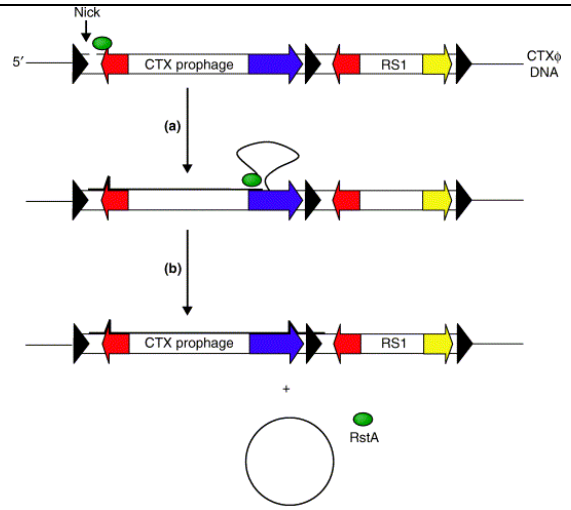


Figure 37. Modèle de production extra-chromosomique d'ADN CTXφ à partir d'un arrangement concomitant des prophages CTX-RS1 (Davis & Waldor, 2003).
L'ADN extra-chromosomique est généré par un processus de réplication qui requiert des éléments en tandem comme matrice. La synthèse de l'ADN est initiée à 400 pb de l'extrémité 5' du prophage, à proximité de l'extrémité 3' du gène *rst*R (flèche rouge), probablement par introduction d'une coupure simple brin de l'ADN par la protéine RstA (ovale vert). (a) Synthèse d'une copie du prophage par déplacement d'un brin de l'ADN et remplacement par un brin nouvellement synthétisé. (b) La synthèse de l'ADN ne s'arrête pas juste après la réplication des gènes terminaux du prophage (*ctx*AB, flèches bleues), mais continue à travers les séquences répétées (triangles noirs) qui représentent les bordures du prophage jusqu'à rencontrer l'origine de réplication de l'élément en aval (dans ce cas, RS1). L'élément en aval peut être soit le phage satellite RS1 (flèche jaune) soit un second prophage CTX. Une fois que la synthèse de l'ADN est achevée, le brin déplacé qui correspond à un génome complet de phage est circularisé et le brin complémentaire peut être synthétisé. La copie chromosomique est laissée intacte.

III.2. *Vibrio cholerae*, une bactérie à deux chromosomes

III.2.1. Structure et évolution du génome des *Vibrionaceae*

L'ensemble des *Vibrionaceae* étudiés à ce jour ont deux chromosomes circulaires (Okada et al., 2005), ce qui suggère que les *Vibrionaceae* dérivent probablement d'un ancêtre commun bi-chromosomique. Au sein des *Vibrionaceae*, la taille du grand chromosome est relativement conservée (3,0 - 3,3 Mb) tandis que la taille du petit chromosome est très variable (0,8 – 2,4 Mb) (Okada et al., 2005). Les deux chromosomes de *V. cholerae*, I et II, font respectivement 2,96 Mb et 1,07 Mb (Tableau 2).

Vibrionaceae species	Genome size (Mb)	% GC	Proteins
Vibrio cholerae N16961	4.03		
Chromosome 1	2.96	47	2,742
Chromosome 2	1.07	47	1,093
Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633	5.17		
Chromosome 1	3.29	45	3,080
Chromosome 2	1.88	45	1,752
Vibrio vulnificus YJ016	5.26		
Chromosome 1	3.35	46	3,259
Chromosome 2	1.86	47	1,696
Plasmid (pYJ016)	0.049	45	69
Vibrio vulnificus CMCP6	5.12		
Chromosome 1	3.28	46	2,926
Chromosome 2	1.84	47	1,562
Vibrio fischeri ES114	4.28		
Chromosome 1	2.91	39	2,575
Chromosome 2	1.33	37	1,172
Plasmid (pES100)	0.045	38	55
Photobacterium profundum SS9	6.4		
Chromosome 1	4.09	42	3,416
Chromosome 2	2.24	41	2,008
Plasmid (pPBPR1)	0.080	44	55

SI, superintegron.

Tableau 2. Description des génomes des six membres séquencés de la famille des *Vibrionaceae* (adapté de (Reen *et al.*, 2006)).
(*V. cholerae* N16961, *V. parahaemolyticus* RIMD2210633, *V. vulnificus* YJ016, *V. vulnificus* CMCP6, *V. fischeri* ES114, *P. profundum* SS9).

Si l'on considère que les *Vibrionaceae* dérivent d'un même ancêtre commun bi-chromosomique, la grande variation de la taille du petit chromosome suggère qu'un plus haut degré de variabilité y réside. L'analyse de la contenance en gènes des grands et petits chromosomes divulgue une très inégale répartition des gènes qui est conservée chez tous les *Vibrionaceae*. La vaste majorité des gènes codant pour les fonctions cellulaires essentielles sont localisées sur le grand chromosome. De plus, la plupart des gènes du grand chromosome présente des homologues connus et caractérisés chez les autres espèces. Au contraire, le petit chromosome contient une grande proportion de gènes hypothétiques ne présentant aucune similarité avec des gènes caractérisés dans d'autres espèces (Reen et al., 2006). Toutefois, le petit

chromosome est pourvu de quelques gènes essentiels, ce qui permet de lui conférer le caractère de chromosome. Curieusement, la composition en nucléotides G+C est quasi-identique entre le grand et le petit chromosome (Tableau 2), ce qui témoigne d'une longue cohabitation des deux chromosomes au cours de l'évolution (Reen et al., 2006). Cette observation est d'autant plus singulière que la variation du pourcentage G+C entre espèces de *Vibrionaceae* peut être élevée, ce qui signifie que la spéciation des *Vibrionaceae* remonte à très longtemps sur l'échelle de l'évolution. Ceci appuie l'hypothèse que la structure bi-chromosomique existait déjà dans l'ancêtre commun des *Vibrionaceae* avant spéciation. L'analyse comparée (BlastP) entre les grands et les petits chromosomes des six espèces séquencées de *Vibrionaceae* (Dryselius et al., 2007), montre clairement un profil de diversification identique entre les deux chromosomes d'une même espèce (Figure 38).

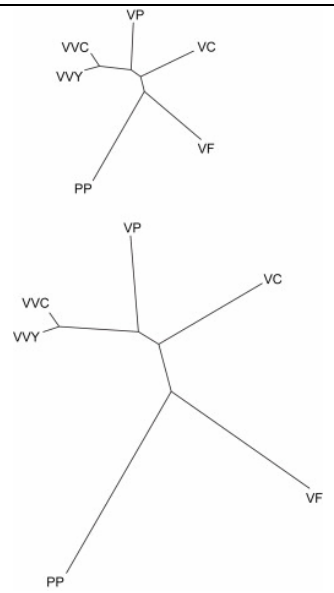


Figure 38. Relations des grands et petits chromosomes de six espèces de *Vibrionaceae* séqencées (Dryselius et al., 2007).
Arbres phylogénétiques pour les grands (en haut) et les petits (en bas) chromosomes basés sur la comparaison des six espèces de *Vibrionaceae* dont la séquence génomique est disponible au public (VC = *V. cholerae* N16961, VP = V. parahaemolyticus RIMD2210633, VVC = V. vulnificus CMCP6, VVY = V. vulnificus YJ016, VF = V. fischeri ES114, PP = P. profundum SS9). La taille des branches illustre les distances relatives entre les chromosomes. Les méthodes d'alignement sont décrites (Dryselius et al., 2007).

En effet, la topologie semblable des deux arbres suggère une longue co-habitation des paires de chromosomes dans la même cellule. Par ailleurs, la longueur des branches des arbres, illustre bien que les petits chromosomes sont sujets à plus de variabilité que les grands chromosomes.

III.2.2. Quels avantages à conserver deux chromosomes ?

La forte conservation de la structure bi-chromosomique des génomes de *Vibrionaceae* au cours de l'évolution témoigne de son importance. Dans cette partie, je reprends quelques hypothèses émises pour justifier de l'avantage des *Vibrionaceae* à avoir un génome partitionné :

(1) Une première hypothèse serait que la répartition du génome en deux chromosomes permettrait de diminuer le temps de réplication et pourrait conférer un avantage sélectif aux bactéries. D'ailleurs, certains *Vibrionaceae* présentent une vitesse de croissance extrêmement rapide, avec des temps de générations inférieurs à dix minutes dans des conditions optimales. Cependant il est peu vraisemblable que cet argument seul explique la présence de deux chromosomes, d'autant que la plupart des bactéries ont un unique chromosome. Par ailleurs, les *Vibrionaceae* ont un taux de tRNA et rRNA supérieur à la normal, ce qui est certainement une des causes probables de leur forte vitesse de croissance (Reen et al., 2006).

(2) Le petit chromosome semble être un haut lieu de plasticité. Il possède d'ailleurs une forte proportion de gènes uniques, ce qui confèreraient aux différentes espèces de *Vibrionaceae* des fonctions spécialisées pour s'adapter à différentes niches écologiques (Reen et al., 2006). Le contenu et la position des gènes du grand chromosome sont globalement conservés entre les *Vibrionaceae* tandis que la similarité de séquence entre les petits chromosomes est limitée (Reen et al., 2006).

Le petit chromosome pourrait être plus réceptif et tolérant pour l'acquisition de nouveaux éléments génétiques que le grand chromosome qui contient la plupart des gènes essentiels à la croissance et la survie de la bactérie et dont la perturbation pourrait s'avérer risquée (Dryselius et al., 2007).

(3) Une théorie s'appuie sur le fait que la division du génome en deux permettrait d'ajuster le niveau d'expression des gènes pour mieux répondre à des conditions environnementales spécifiques. Chez *V. cholerae*, de manière générale, les gènes présents sur le chromosome I sont plus exprimés que ceux du chromosome II, ce qui est sans doute lié à la présence de la plupart des gènes de croissance sur le grand chromosome (Xu *et al.*, 2003). En comparant le biais de composition en gènes des deux chromosomes de *V. cholerae*, Heidelberg et coll. avait conjecturé que sous certaines conditions environnementales il pourrait y avoir une différence du nombre de copie entre les deux chromosomes (Heidelberg et al., 2000). Il a été montré chez *V. cholerae* que la stimulation d'un stress cellulaire en conditions défavorables de croissance entrainent une élévation de l'expression des gènes présent sur le petit chromosome (Xu et al., 2003). Ainsi il a été suggéré que le petit chromosome pourrait jouer un rôle d'adaptation des différentes espèces aux changements environnementaux. Une manière d'ajuster le niveau d'expression des gènes serait de modifier la balance 1 : 1 entre le nombre de copies des chromosomes. Une autre manière serait de désynchroniser l'initiation de la réplication des deux chromosomes (Dryselius et al., 2007).

III.2.3. Le petit chromosome : domestication d'un mégaplasmide ?

L'origine du petit chromosome est le sujet de nombreux débats. Les deux chromosomes pourraient provenir de la division d'un unique chromosome ancestral ou le petit chromosome pourrait résulter de l'acquisition d'un mégaplasmide. La

première hypothèse semble être plutôt invraisemblable du fait de la répartition très inégale des gènes sur les deux chromosomes. Sur la base de la séquence du petit chromosome de *V. cholerae*, Heidelberg et coll. ont émis l'hypothèse qu'un ancêtre de *Vibrionaceae* aurait acquis un méga-plasmide et l'aurait domestiqué en lui transférant quelques gènes essentiels du grand chromosome (Heidelberg et al., 2000). Cette théorie est soutenue par le fait que les systèmes de réplication et de ségrégation des deux chromosomes soient différents et que bien souvent ceux du petit chromosome soient apparentés à des systèmes d'origine plasmidique (Egan & Waldor, 2003, Yamaichi *et al.*, 2007). Bien que de nombreuses données tendent à privilégier la théorie de l'acquisition d'un mégaplasmide à celle d'une scission de chromosome, il est difficile de comprendre comment un tel élément exogène ait été gardé au cours de l'évolution par la cellule. Ceci pourrait s'expliquer par le transfert rapide de gènes essentiels du grand chromosome vers le mégaplasmide, le rendant ainsi indispensable à la survie de la bactérie (Heidelberg *et al.*, 2000).

III.2.3.1. Des systèmes partagés et distincts gouvernent la réplication des deux chromosomes

Chez *V. cholerae*, les origines de réplication des deux chromosomes sont différentes (Figure 39), l'origine du chromosome I montre de fortes similitudes avec celle de *E. coli* (Heidelberg et al., 2000) et l'origine du chromosome II possède des caractéristiques retrouvées sur certains plasmides tels que P1 et F (Egan & Waldor, 2003).

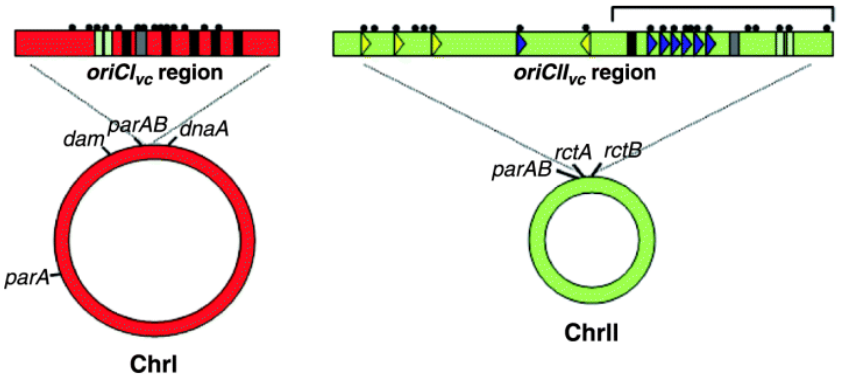


Figure 39. Besoin communs et distinct pour la réplication des deux chromosomes de V. cholerae (Egan *et al.*, 2005).
Les origines de réplication du grand chromosome (*oriCI*$_{vc}$) et du petit chromosome (*oriCII*$_{vc}$) sont grossit respectivement en rouge et vert. Les deux origines contiennent des régions riches en AT (rectangle vert clair), des sites putatif pour IHF (rectangle gris foncé), des sites de méthylation GATC (rond noirs). *oriCI*$_{vc}$ contient cinq site de fixation de DnaA (rectangle noir) alors qu'*oriCII*$_{vc}$ a un seul site pour DnaA. *oriCII*$_{vc}$ contient aussi deux séquences similaires répétées de 11-mer (triangle jaune) et 12-mer (triangle bleu). L'origine minimale *oriCII*$_{vc}$ est désignée par une accolade. Les gènes *rct*A et *rct*B du chromosome II sont absolument requis pour seulement la réplication à *oriCII*$_{vc}$ alors que les gènes dam et *dna*A localisés sur le grand chromosome sont requis pour la réplication des deux chromosomes. La localisation chromosomique des gènes par, ayant un rôle dans la partition des chromosomes sont indiqués.

L'initiation du grand chromosome nécessite DnaA en tant que régulateur majeur, tandis que le petit chromosome implique un facteur protéique RctB et un petit ARN *rct*A (Egan & Waldor, 2003). A l'encontre d'autres systèmes multipartites étudiés chez les α-protéobactéries, où l'initiation des chromosomes est totalement indépendante (Egan *et al.*, 2005), chez *V. cholerae*, la réplication des deux chromosomes est partiellement liée. En effet, DnaA et Dam possèdent un rôle essentiel dans la réplication des deux chromosomes (Egan & Waldor, 2003, Egan *et al.*, 2006). Cependant, la régulation de l'initiation de la réplication de deux chromosomes semble être dépendante de facteurs distincts. En effet, la surexpression de DnaA entraine une sur-initiation de la réplication exclusivement du grand chromosome et la surexpression de RctB entraine une sur-initiation du petit chromosome seulement (Duigou et al., 2006). DnaA est donc indispensable à la réplication du petit chromosome mais sa surexpression n'entraine pas de sur-

initiation du petit chromosome (Duigou et al., 2006). Récemment des travaux menés par Srivastava et coll (Srivastava & Chattoraj, 2007) montrent qu'en milieu riche, les cellules de *V. cholerae* peuvent contenir jusqu'à 4 copies de l'origine du chromosome I, tout en gardant uniquement 2 copies de l'origine du chromosome II (Srivastava & Chattoraj, 2007). L'augmentation du nombre de copie du petit chromosome, en surexprimant RctB ou en délétant *rct*A, ralentit la vitesse de croissance des cellules, ce qui suggère qu'il est important de garder bas le nombre de copie du petit chromosome (Srivastava & Chattoraj, 2007). Il est probablement intéressant pour la bactérie d'avoir un génome partitionné, car elle peut garder bas le nombre de copie du petit chromosome lorsque les conditions de croissance sont favorables afin de permettre une croissance rapide des bactéries en amplifiant sélectivement le grand chromosome.

Deux équipes s'accordent pour dire que chez *V. cholerae*, la réplication des deux chromosome est coordonnée au cycle cellulaire (Egan *et al.*, 2004, Rasmussen *et al.*, 2007). Cependant le mode de synchronie entre les deux chromosomes reste encore flou. Egan et coll. ont présentés un modèle dans lequel l'initiation de la réplication des deux chromosomes est synchrone (Egan et al., 2004). Plus récemment, Rasmussen et coll. réfutent ce modèle en montrant que la réplication du chromosome II n'est initiée que quand la majeur partie du chromosome I a été répliquée (Rasmussen et al., 2007) et que les deux chromosomes termineraient leur réplication approximativement en même temps (Figure 40). Certains nouveaux résultats de Srivastava et coll. entre en accord avec ce nouveau modèle de synchronisation de la terminaison (Srivastava & Chattoraj, 2007), cependant leurs études de localisation cellulaire s'accordent avec le modèle de synchronisation de

l'initiation car ils observent que les origines des deux chromosomes se dupliquent en même temps (Srivastava & Chattoraj, 2007).

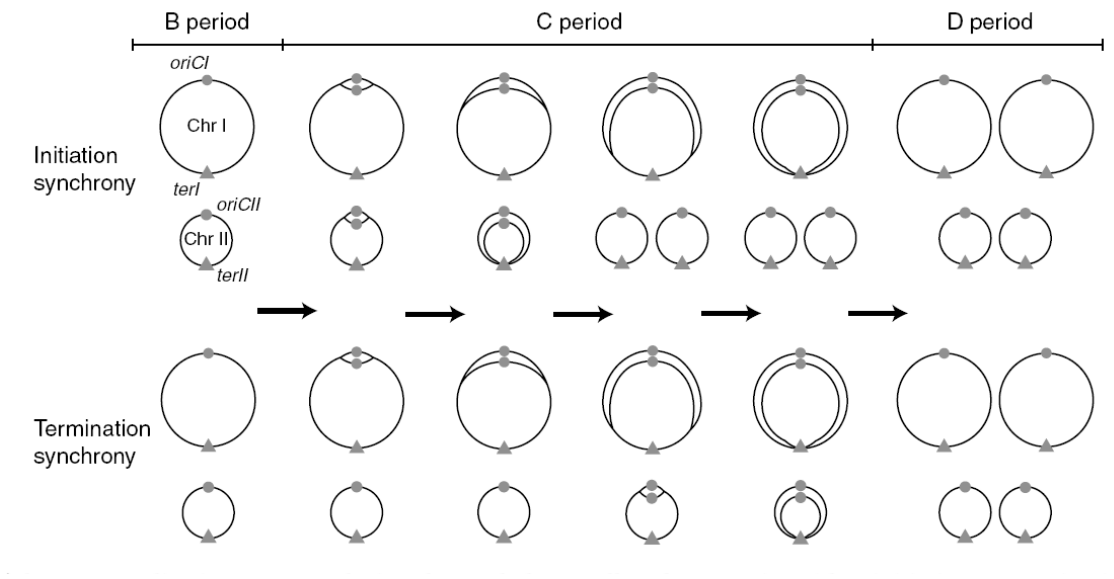


Figure 40. Modèles d'initiation et de terminaison synchrone de la réplication des deux chromosomes de *V. cholerae* (Rasmussen et al., 2007).
La vitesse de réplication est supposée égale pour les deux chromosomes et constante durant toute la période C.

III.2.3.2. Deux systèmes distincts gouvernent la partition des origines des deux chromosomes

Après réplication, les origines des deux chromosomes de *V. cholerae* présentent des modes de ségrégation différents (Figure 41). Dans les cellules jeunes, l'origine du grand chromosome est présente aux pôles alors que l'origine du petit chromosome réside au centre de la cellule (Fogel & Waldor, 2005). Après réplication de la région de l'origine du grand chromosome, une des origines migre à travers la cellule vers le pôle opposé de la cellule, tandis que l'autre reste stationnaire. Les origines du petit chromosome ségrégent quant à elles de manière symétrique vers les positions ¼ et ¾ de la cellule (Fogel & Waldor, 2005).

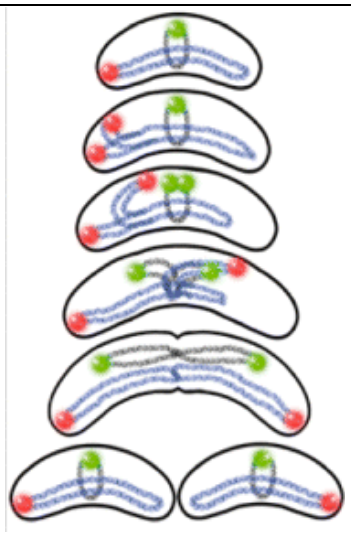


Figure 41. Modèle de la dynamique de ségrégation des origines des deux chromosomes de *V. cholerae* (Fogel & Waldor, 2005).
L'origine du grand chromosome est représenté en rouge, et celle du petit chromosome est représenté en verte.

Ces différents profils de ségrégation reflètent la présence de mécanismes distincts qui gouvernent la partition des chromosomes. En effet, les deux chromosomes ont des systèmes de partition (ParAB1 et ParAB2) d'origines différentes. Sur la base de l'analyse phylogénétique de la protéine ParA, le système ParAB1 du grand chromosome semble être d'origine chromosomique, alors que le système ParAB2 du petit chromosome aurait une origine plasmidique (Heidelberg et al., 2000). Chaque système ParAB est strictement spécifique de la partition de son propre chromosome (Fogel & Waldor, 2006, Yamaichi et al., 2007). ParAB1 gouverne la localisation de l'origine de réplication du grand chromosome mais son inactivation n'empêche pas une correcte ségrégation des chromosomes (Fogel & Waldor, 2006). Par contre le système ParAB2 du petit chromosome est essentiel à sa partition (Yamaichi et al., 2007) et la perte du petit chromosome est létale à la cellule (Figure 42).

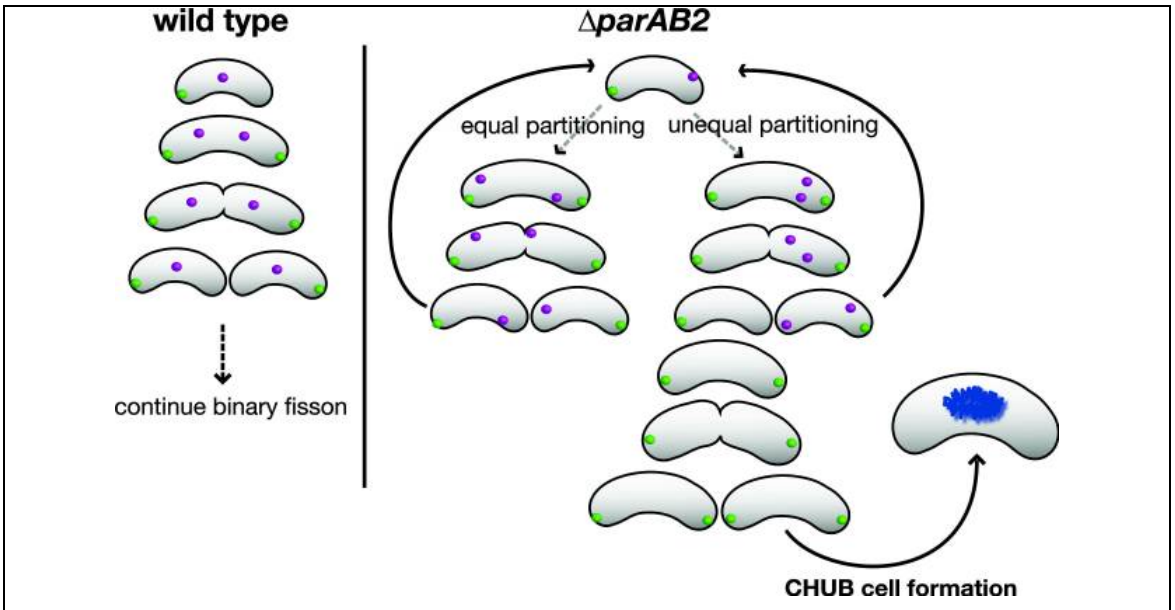


Figure 42. Représentation schématique de la ségrégation de l'origine des deux chromosomes de *V. cholerae* et perte létale du petit chromosome dans un mutant Δ*par*AB2 (Yamaichi et al., 2007).
A gauche, schéma représentant le profil de ségrégation des origines du grand chromosome (vert) et du petit chromosome (violet) dans un contexte sauvage. A droite, dans un mutant Δ*par*AB2, l'origine du petit chromosome est aléatoirement localisée. La division cellulaire peut donc résulter en cellules filles qui peuvent contenir ou pas le petit chromosome. Les cellules dépourvues du petit chromosome se divisent une seule fois et leur progéniture développe des cellules CHUB (condensed nucleoid, hypertrophic, undividing bacteria).

III.2.3.3. Ségrégation du terminus de réplication des deux chromosomes

L'observation de la ségrégation des terminus de réplication des deux chromosomes de *V. cholerae* donne des résultats mitigés. Dans 50 % des cas, le locus *ter* du chromosome II est ségrégé beaucoup plus tôt que celui du chromosome I et dans 50% des cas les loci *ter* des deux chromosomes sont co-localisés (Srivastava *et al.*, 2006).

III.2.3.4. Un système commun de résolution des dimères des deux chromosomes

Les données recueillies avant le démarrage de ma thèse suggéraient que les recombinases XerCD de *V. cholerae* puissent agir sur divers sites de recombinaison,

les deux sites *att*P (I et II) de CTXφ et les deux sites de résolution des dimères des deux chromosomes (*dif*1 et *dif*2) (Huber & Waldor, 2002, McLeod & Waldor, 2004). Ces quatre sites ont des structures très différentes, notamment au niveau de la région centrale dont la taille et la séquence varie énormément. Par ailleurs, il avait été reporté que XerD clivait le site *dif*1 de manière non canonique dans la région centrale (McLeod & Waldor, 2004), ainsi il avait été suggéré que cela pouvait jouer sur la capacité des recombinases à travailler sur différents substrats. Pendant la première partie de ma thèse, je me suis attachée à l'analyse du mode de recombinaison des recombinases XerC/D sur ces différents substrats. Mes résultats sont présentés en première partie et deuxième partie des résultats de thèse avec la présentation de deux articles : *'The Single-Stranded Genome of Phage CTX Is the Form Used for Integration into the Genome of Vibrio cholerae' et 'FtsK-dependent dimer resolution on multiple chromosomes in the pathogen Vibrio cholerae'.*

Mon étude du mécanisme de recombinaison à *dif*1 et *dif*2 montre que la résolution des dimères des deux chromosomes suit une voie commune et dépendante de la protéine FtsK. Vu que FtsK est active dans une très courte fenêtre de temps et cela peu avant la fermeture du septum de division (Kennedy et al., 2008), la résolution des dimères des deux chromosomes doit être quasi-synchrone. Le fait que FtsK est à agir sur deux chromosomes plutôt qu'un suggèrerait qu'elle pourrait avoir un rôle plus important chez *V. cholerae* que chez *E. coli*. L'étude du rôle de FtsK dans la ségrégation des chromosomes chez *V. cholerae* est présentée en troisième volet de mes résultats de thèse intitulé *'FtsKc possède une nouvelle fonction dans la ségrégation des chromosomes chez V. cholerae'.*

RESULTATS

Figure 43. Organisation génétique des prophages CTX et RS1 intégrés au site *dif*1 du grand chromosome de la souche O1-El Tor N16961 (McLeod *et al.*, 2005)

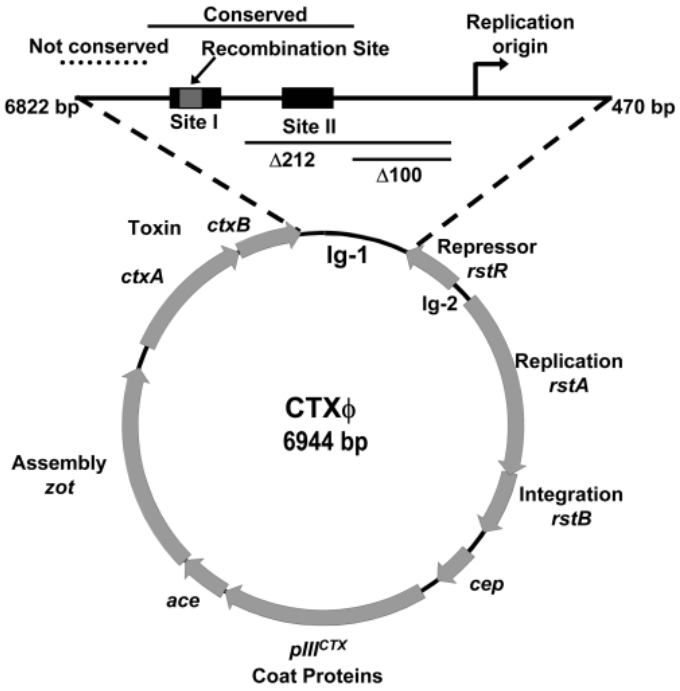


Figure 44. Représentation schématique de genome de CTXφ (McLeod & Waldor, 2004).
Les flèches grises représentent l'orientation des gènes. La région intergénique Ig-1 de 592 pb est grossit. Elle contient deux sites de fixation des recombinases XerC/D (rectangles noirs) et l'origine de réplication *ori+* (flèche repliée). Les régions de conservation de Ig-1 entre différents variants de CTX sont indiquées. La recombinaison a lieu au site I de *att*P (indiqué). Lors de la réaction d'intégration, la région centrale du site I (rectangle gris) est échangée avec le site *dif*1 du chromosome bactérien. La délétion du fragment Δ100 n'empêche pas l'intégration du phage. Par contre la délétion du fragment Δ212 (délétion du site II) abolit l'intégration du phage (McLeod & Waldor, 2004).

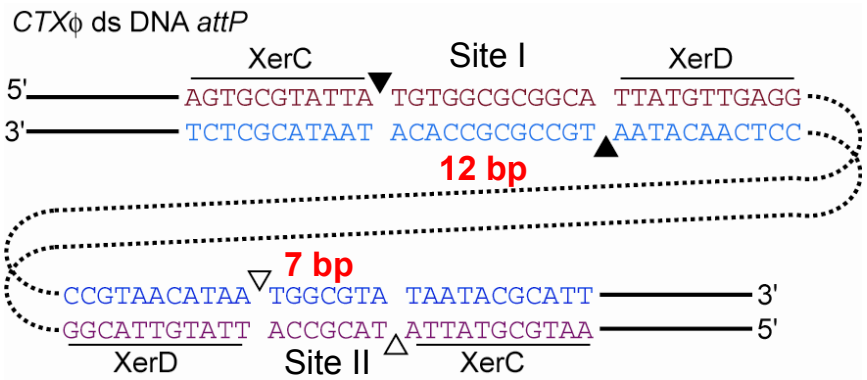


Figure 45. Représentation des sites I et II du site *att*P séparés par une séquence de 90pb dans la forme réplicative double brin de CTXφ.
Les sites de fixation de XerC et XerD sont représentés au-dessus. Les triangles représentent les sites putatifs de coupure des recombinases XerC et XerD. La distance entre les sites de fixation des recombinases est indiquée en rouge.

I. Résultats publiés :

THE SINGLE-STRANDED GENOME OF PHAGE CTX IS THE FORM USED FOR INTEGRATION INTO THE GENOME OF *VIBRIO CHOLERAE*

En collaboration avec Marie Bouvier et Didier Mazel, nous avons étudiés le mécanisme de catalyse des recombinases XerC/D dans l'intégration du phage CTXφ. Nous avons pu mettre en évidence un système insolite d'intégration du phage sous sa forme d'ADN simple brin.

I.1. Données qui ont conduit à l'hypothèse d'une intégration simple brin de CTXφ

Dans la souche O1 El Tor N16961 séquencée par Heidelberg et coll., CTXφ est intégré au niveau du site *dif*1 du grand chromosome, adjacent au phage satellite RS1 (Figure 43). Le site *att*P d'intégration de CTXφ est situé dans une zone intergénique Ig-1 localisée entre les gènes *ctx*B et *rst*R (McLeod & Waldor, 2004). Le site *att*P renferme deux sites (I et II) de fixation des recombinases XerC/D et qui sont séparés par une séquence d'environ 90 pb (Figure 44). Des expériences de footprint ont montré que les recombinases XerC/D de *V. cholerae* se fixent au niveau de ces deux sites de *att*P ainsi que sur le site *att*B chromosomique (*dif*1) (McLeod & Waldor, 2004). L'analyse des jonctions prophage-chromosome montre que la réaction de recombinaison se déroule au niveau du site I de *att*P. Cependant, la délétion du site II abolit l'intégration du phage, suggérant que les deux sites I et II sont essentiels à l'intégration de CTXφ (McLeod & Waldor, 2004).

	XerC	RC	XerD
*dif*1	AGTGCGCATTA	TGTATG	TTATGTTAAAT
*dif*2	AATGCGCATTA	CGTGCG	TTATGTTAAAT
site I *att*P	AGTGCGTATTA	TGTGGCGCGGCA	TTATGTTGAGG
site II *att*P	AATGCGTATTA	TACGCCA	TTATGTTACGG

Figure 46. Séquence des sites *dif*1 (*att*B), *dif*2, et des sites I et II de *att*P.
Les sites de fixation des recombinases XerC et XerD sont indiqués au dessus, RC signifie région centrale. Les bases soulignées sont les trois nucléotides TGT homologues entre *dif*1 et le site I de *att*P et qui permettent l'échange de brin. En rouge sont représentées les bases qui diffèrent entre le site *dif*1 et le site I *att*P, et qui sont retrouvées sur le site II *att*P.

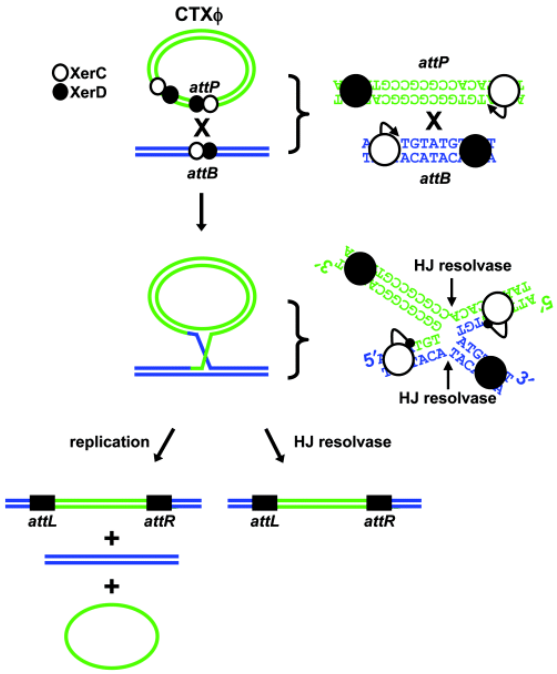


Figure 47. Modèle d'intégration double brin de CTXφ au niveau du site *dif*1 de *V. cholerae* par les recombinases XerC et XerD de l'hôte (McLeod et al., 2005).
La recombinaison a lieu entre le site *att*B (*dif*1) et le site I de *att*P générant les jonctions phage-chromosome (*att*L et *att*R). CTXφ est représenté en vert, le chromosome bactérien est représenté en bleu. XerC et XerD sont représentées par des cercles blancs et noirs respectivement. Les recombinases se fixent sur trois sites, le site *att*B, le site I de *att*P et le site II de *att*P. Les sites I et II sont en orientation inverse. Le détail de la première étape d'échange de brin est représenté à droite. Le modèle proposé est que XerC catalyse le premier échange de brin pour former un intermédiaire de jonction de Holliday. Cette structure pourrait être résolue par une résolvase de jonction de Holliday ou le passage de la fourche de réplication. Le passage de la fourche de réplication donne lieu à trois produits : le prophage intégré, la copie parentale du chromosome bactérien et une copie simple brin du génome phagique.

La séquence du site I présente une incohérence quant à la taille de la région centrale par rapport à ce que l'on connait sur les besoins requis pour l'activité des recombinases. En effet, les sites de fixation des recombinases XerC/D sont espacés de 12 pb sur le site I, ce qui devrait empêcher l'interaction des recombinases (Figure 45). Le site *dif*1 et le site I partage une homologie de séquence de 3 pb (TGT) mais uniquement du côté du site de coupure de XerC. Ceci suggère qu'une seule paire d'échange de brin entre *dif*1 et le site I est possible et que l'échange ne peut être catalysé que par XerC. De plus, il a été montré que le phage intègre son génome par un processus indépendant de la protéine FtsK (Huber & Waldor, 2002) et la voie connue de recombinaison Xer à *dif* en l'absence de FtsK est initiée par XerC et donne lieu à un échange non productif et réversible (Aussel *et al.*, 2002).

Le site II possède une région centrale de 7 pb qui rend possible l'interaction des recombinases mais la région centrale du site II ne partage aucune homologie avec la région centrale de *dif*1. Cette dernière observation explique pourquoi la réaction de recombinaison semble ne pas avoir lieu au niveau du site II d'*att*P.

En suivant le même raisonnement, on explique pourquoi CTXφ ne s'intègre pas au niveau du site *dif*2 de la souche N16961, puisque la région centrale de *dif*2 ne présente aucune homologie avec les deux sites I et II d'*att*P (Figure 46). Par contre, si on remplace le site *dif*2 par un site *dif*1 dans le génome de *V. cholerae* alors CTXφ peut s'intégrer dans le petit chromosome (Val et Barre, non publié).

Avec l'ensemble de ces données, un modèle a été proposé dans lequel le site II était considéré comme une séquence accessoire adjacente au site I de recombinaison (Figure 47). Les recombinases XerC/D sur le site II pourrait exercer un rôle architectural afin de favoriser les interactions entre les recombinases XerC/D du site I

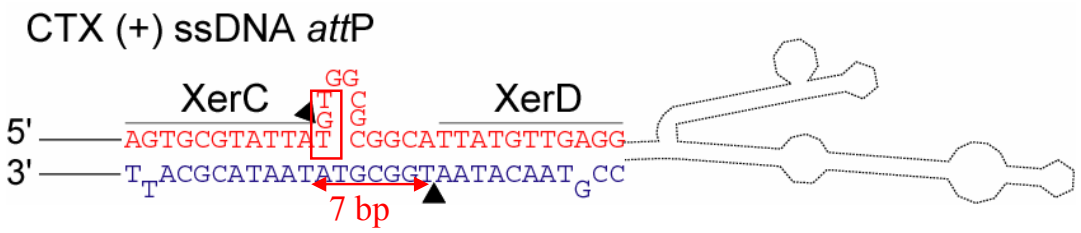


Figure 48. Site simple brin d'intégration de CTXφ en structure d'épingle à cheveux.
Les sites de fixation des recombinases sont indiqués au dessus. Les sites présumés de clivage des recombinases sont indiqués par un triangle noir. Le brin 'Top' est représenté en rouge et le brin 'Bottom' en bleu.

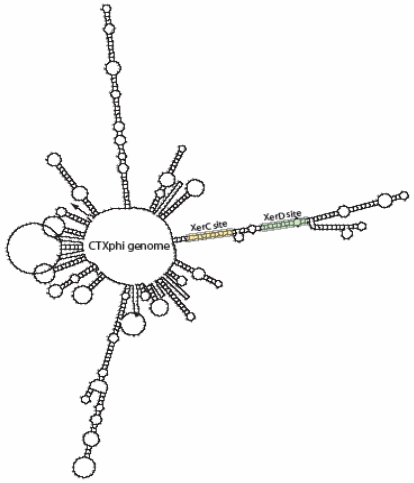


Figure 49. Prédictions de structures secondaires formées par le génome simple brin de CTXφ.
Environ 3 Kb du génome simple brin de CTXφ entourant la région Ig-1 a été soumis au logiciel RNAfold (SantaLucia, 1998). La flèche noire indique les extrémités 3' et 5' du génome simple brin. Les sites de fixations des recombinases XerC et XerD sont indiqués en jaune et vert respectivement.

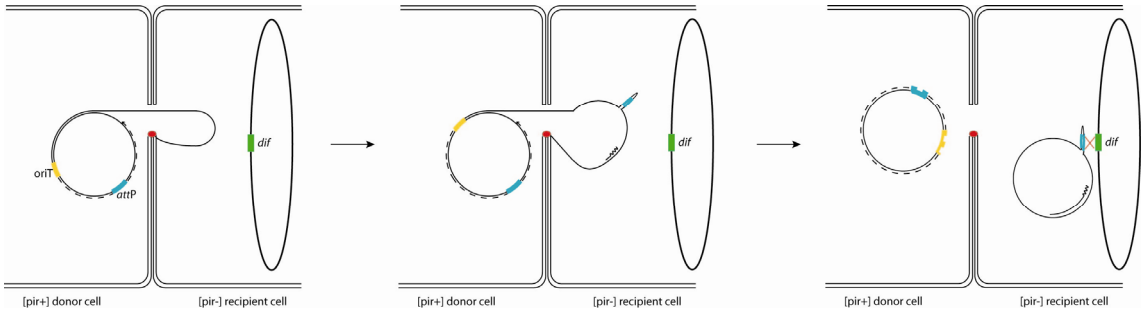


Figure 50. Schéma du système de conjugaison utilisant un vecteur suicide (réplication pir-dépendante) contenant le site *att*P.
Le vecteur peut se répliquer dans la cellule donneuse (*pir*+) mais pas dans la cellule receveuse (*pir*-). Le plasmide est transféré sous forme simple brin à la cellule receveuse, et si *att*P est présent sur le brin transféré, le plasmide va pouvoir être intégré au site *dif* 1 de la receveuse.

éloignées par 12 pb (McLeod & Waldor, 2004). Cependant la biochimie de la réaction était encore largement incomprise.

L'observation plus approfondie de la séquence du site *att*P montre que les deux sites I et II sont disposés en orientation inverse. De plus, sur les quatre bases qui diffèrent au niveau des sites de fixation des recombinases entre le site *dif*1 et le site I de *att*P, trois bases sont également retrouvées sur le site II de *att*P (Figure 46). Les chances que les deux sites I et II aient acquis les mêmes mutations sont assez faibles d'autant plus que deux des mutations sont sur le site de fixation de XerD dont la séquence est extrêmement bien conservée. La forte ressemblance des sites I et II et leur orientation inversée suggèrent que dans le génome simple brin du phage, les sites I et II pourraient s'hybrider l'un avec l'autre pour recréer un site de recombinaison double brin des recombinases XerC/D. Cette hypothèse est d'autant plus vraisemblable que la région de 90 pb séparant les sites I et II a un fort caractère palindromique (Figure 48). Lorsque l'on soumet une grosse portion du génome de CTXφ à un logiciel de prédiction de structures secondaires (SantaLucia, 1998), on retrouve la région d'intégration *att*P repliée sur elle-même formant une structure double brin en épingle à cheveux où les sites I et II s'hybrident l'un sur l'autre (Figure 49). Ce site double brin reconstitué des sites I et II pourrait être un site potentiel des recombinases XerC/D. La structure de ce site potentiel de recombinaison est présentée en Figure 48 avec sa région centrale formant une bulle à cause de bases non appariées. Cette structure aurait l'avantage d'acquérir les particularités des deux sites : les sites de fixation des recombinases sont rapprochés du fait de la taille de la région centrale du site II et la région centrale possède 3 nucléotides TGT d'homologie avec *dif*1 sur le site I. La bulle de mésappariement de la région centrale

pourrait stabiliser l'intermédiaire de jonction de Holliday en défavorisant la réaction inverse.

I.2. Preuves expérimentales de l'intégration simple brin de CTXφ

Des expériences *in vitro* en utilisant un substrat reformant le site *att*P simple brin de CTXφ nous ont permis de démontrer que le substrat de la réaction d'intégration est le brin (+) du phage. Nos résultats montrent qu'un seul échange de paire de brin entre *dif*1 et *att*P simple brin conduit à la formation d'un intermédiaire de jonction d'Holliday. Cet échange d'une paire de brin ne sollicite que l'activité catalytique de XerC, mais nécessite cependant la présence de XerD pour la recombinaison. Pour justifier de l'importance de la structure repliée de *att*P simple brin, j'ai remplacé des bases impliquées dans le repliement mais n'affectant ni la reconnaissance ni l'activité des recombinases Xer. Lorsque la structure secondaire est ainsi perturbée, l'échange de brin n'est plus observé entre *dif*1 et *att*P. La complémentation des mutations sur le brin complémentaire, permet de rétablir un échange de brin entre le site *dif*1 et le site *att*P. L'importance d'un correct repliement de *att*P est donc primordial à l'échange d'une paire de brin entre *att*P et *dif*1.

Ces résultats *in vitro* ont été confirmés *in vivo* par Marie Bouvier, d'une part pour vérifier que la réaction d'échange de brin observée *in vitro* est également possible dans l'environnement de la cellule et d'autre part pour montrer que la formation d'un intermédiaire de jonction de Holliday peut-être ensuite résolu dans la cellule pour permettre l'intégration du génome phagique au niveau du site *dif*1. Pour cela, un vecteur conjugatif de type suicide portant le site *att*P du phage CTX a été utilisé. Ce vecteur est incapable de se répliquer par lui même dans la bactérie hôte, mais la présence du site *att*P lui permet, le cas échéant, de s'intégrer à *dif*1 (Figure 50). Le

transfert de plasmide par conjugaison se produit par transfert d'un simple brin d'ADN de la donneuse vers la receveuse. Cette caractéristique nous permet de mimer la délivrance du génome simple brin de CTXφ dans la cellule hôte. L'essai a été mis en place dans une souche d'*E. coli* exprimant les différents partenaires protéiques nécessaires à la recombinaison Xer de *V. cholerae*. Les résultats obtenus nous ont permis de montrer que le site *att*P du brin (+) de 163 nucléotides est suffisant à l'intégration du plasmide suicide dans *dif*1. Comme pour les essais *in vitro*, des essais d'échange de bases et de complémentation n'affectant que le repliement du site *att*P ont été testées pour montrer l'importance de la structure de *att*P *in vivo*. Nous sommes arrivés à la même conclusion, le correct repliement de *att*P est primordial à l'intégration à *dif*1.

I.3. Conclusion

Nous avons découvert un modèle insolite d'intégration de bactériophages qui peuvent rester sous leur forme simple brin pour s'intégrer dans le génome double brin de bactéries. Cette stratégie d'intégration pourrait être généralisée à d'autres phages filamenteux tels que CUSφ-1 et CUSφ-2 dont la région *att*P répond aux mêmes critères que celle de CTXφ (Gonzalez et al., 2002). De plus, notre collaboration sur ce projet avec Marie Bouvier et Didier Mazel a été initiée par l'observation d'un parallèle structural entre le site d'intégration du phage CTXφ (*att*P) et des cassettes d'intégrons (*att*C). Leurs travaux ont montrés conjointement à ceux de CTXφ que les cassettes d'intégrons utilisent un système similaire d'intégration simple brin (Bouvier *et al.*, 2005).

L'intégration du phage CTXφ sous forme simple brin assure sa stabilité dans le génome de la bactérie. En effet, la plupart des phages lysogènes peuvent s'exciser du chromosome bactérien à moins qu'un évènement rare inactive un des sites

flanquants du prophage. Seulement, il a été observé que CTXφ n'est jamais excisé du chromosome bactérien. L'intégration sous forme simple brin du phage nous permet de comprendre l'absence d'excision du prophage. Le prophage est encadré par les sites *att*P et *dif*1. Le site *att*P n'est fonctionnel que si le simple brin est replié sur lui-même, il est donc inactif dans le chromosome sous forme double brin. Pour les mêmes raisons mécanistiques rencontrées pour l'intégration, *dif*1 ne peut pas recombiner avec *att*P double brin et entraîner, dans ce cas-ci, l'excision du prophage. Dans les souches virulentes contemporaines de *V. cholerae*, le phage est intégré en tandem. Dans cette configuration, le brin (+) de CTXφ peut être produit par mécanisme de cercle roulant initiée à partir de l'*ori*+ du premier prophage et se terminant sur l'*ori*+ du second prophage (Moyer et al., 2001). Si ce mode de production du phage à partir de la forme intégrée est réellement le seul possible, on peut s'interroger sur la stratégie d'intégration du phage CTXφ : intégrer une seule copie du phage condamnerait le phage à rester dormant. On peut donc se demander s'il existe un mécanisme qui favorise l'intégration du phage en tandem.

Nous avons montré que la recombinaison Xer seule n'est pas suffisante pour intégrer complètement le phage. La recombinaison Xer permet une paire d'échange de brin catalysée par XerC conduisant à la formation d'une jonction de Holliday non résolue par XerD. Ce défaut du système Xer à catalyser une réaction complète d'intégration est en fait un avantage primordial pour la survie de la bactérie. En effet, l'intégration d'une structure en épingle à cheveux circulaire simple brin dans une molécule circulaire double brin revient à intégrer une molécule linéaire dans une molécule circulaire. Les évènements d'intégration entre une molécule circulaire et une molécule linéaire conduisent à la linéarisation de la molécule circulaire. Ainsi si XerD résolvait la jonction de Holliday, il y aurait linéarisation du chromosome bactérien, ce

qui pourrait être détrimentaire à la bactérie (cf. Discussion). *In vitro*, la réaction de recombinaison entre CTXφ ssDNA et *dif*1 mène à la formation d'une jonction de Holliday. *In vivo*, cette réaction est finalisée pour conduire à l'intégration complète du phage dans le chromosome bactérien. Les facteurs cellulaires responsables de cette seconde étape d'intégration sont encore inconnus. Pour la même raison que précédemment évoquée, il est peu probable qu'une résolvase de jonction de Holliday fasse le travail puisque les évènements de résolution conduiraient soit à l'excision du phage soit à la linéarisation du chromosome. Il est donc envisageable que la seconde étape d'intégration du phage se fasse par réplication, lors du passage de la fourche. Ceci conduirait à la formation de deux types de produits : le chromosome parental et le chromosome contenant le prophage (cf. Discussion).

Molecular Cell, Vol. 19, 559–566, August 19, 2005, Copyright ©2005 by Elsevier Inc. DOI 10.1016/j.molcel.2005.07.002

The Single-Stranded Genome of Phage CTX Is the Form Used for Integration into the Genome of *Vibrio cholerae*

Marie-Eve Val,[1,2,6] Marie Bouvier,[3,6] Javier Campos,[4] David Sherratt,[5] François Cornet,[2] Didier Mazel,[3,*] and François-Xavier Barre[1,2,*]
[1]Centre de Génétique Moléculaire
CNRS UPR2167
Avenue de la Terrasse
91198 Gif sur Yvette Cedex
France
[2]Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaires
CNRS UMR5100
118 Route de Narbonne
31062 Toulouse Cedex 4
France
[3]Unité Postulante Plasticité du Génome Bactérien
CNRS URA2171
Institut Pasteur
25 Rue du Dr Roux
75724, Paris
France
[4]Departamento de Genetica
Centro Nacional de Investigaciones Cientificas
AP 6412, Havana
Cuba
[5]Division of Molecular Genetics
Department of Biochemistry
University of Oxford
South Parks Road
Oxford OX1 3QU
United Kingdom

Summary

A major determinant of *Vibrio cholerae* pathogenicity, the cholera enterotoxin, is encoded in the genome of an integrated phage, CTXϕ. CTXϕ integration depends on two host-encoded tyrosine recombinases, XerC and XerD. It occurs at *dif1*, a 28 bp site on *V. cholerae* chromosome 1 normally used by XerCD for chromosome dimer resolution. The replicative form of the phage contains two pairs of binding sites for XerC and XerD in inverted orientations. Here we show that in the single-stranded genome of the phage, these sites fold into a hairpin structure, which creates a recombination target for XerCD. In the presence of XerD, XerC can catalyze a single pair of strand exchanges between this target and *dif1*, resulting in integration of the phage. This integration strategy explains why the rules that normally apply to tyrosine recombinase reactions seemed not to apply to CTXϕ integration and, in particular, why integration is irreversible.

*Correspondence: barre@cgm.cnrs-gif.fr (F.-X.B.); mazel@pasteur.fr (D.M.)
[6]These authors contributed equally to this work.

Introduction

V. cholerae is the causative agent of the severe diarrheal disease cholera. A major determinant of its pathogenicity, the cholera enterotoxin, is encoded in the genome of an integrated phage, CTXϕ (see Davis and Waldor [2003] for review). CTXϕ is a filamentous phage. Its encapsulated genome consists of a single circular strand of DNA, termed (+) ssDNA. CTXϕ particles bind to a specific target on the surface of the bacterium, the toxin coregulated pilus (TCP). Infection also requires the host to express the outer membrane receptor proteins TolQ, TolR, and TolA. After adsorption to the cell wall, the (+) ssDNA viral genome is injected into the cytoplasm of the cell. The current view of the CTXϕ life cycle is that DNA complementary to the phage genome is then synthesized to generate a dsDNA replicative form and that this form is the substrate for integration (McLeod and Waldor, 2004).

To integrate into the genome of *V. cholerae*, CTXϕ uses two host-encoded tyrosine recombinases, XerC and XerD (Huber and Waldor, 2002). These recombinases are conserved in most bacteria with circular chromosomes, like *V. cholerae*, in which they serve to resolve chromosome dimers at cell division (see Lesterlin et al. [2004] for review). Chromosome dimers are created by homologous recombination events between circular sister chromosomes. They are resolved by the addition of a crossover by XerCD at a specific site on each chromosome. Xer recombination has been mainly studied in *Escherichia coli*, but its strong conservation allows for generalization of findings in this bacterium to other species, especially to close relatives such as *Haemophilus influenzae* (Bigot et al., 2004; Yates et al., 2003) and *V. cholerae* (Huber and Waldor, 2002; McLeod and Waldor, 2004). The XerCD recombination site on the *E. coli* chromosome is *dif*; its counterpart on the two *V. cholerae* chromosomes are *dif1* and *dif2* (Figure 1A). *dif* sites are composed of binding sites for XerC and XerD, separated by a 6 bp central region. Upon binding to *dif*, XerC and XerD can each catalyze the cleavage of a specific strand immediately 3′ to their binding site (Figure 1A, triangles on red and blue strands, respectively) to generate recombinase/DNA covalent phosphotyrosyl linkages similarly to Type 1B topisomerases. Cleavage and rejoining can occur, even in the absence of the partner recombinase. This can lead to relaxation of the DNA substrate (Cornet et al., 1997). However, the action of single isolated recombinases is limited by the cooperativity of binding of XerC and XerD to *dif*. Interactions between XerC and XerD help the formation of synaptic complexes containing two *dif* sites and two pairs of recombinases. The XerCD interactions also control the catalytic state of the recombinases within these complexes, ensuring that two pairs of strand exchanges are sequentially performed by XerC and XerD (Hallet et al., 1999). In addition, a full recombination reaction between *dif* sites requires the presence of a cell division protein, FtsK, which promotes the formation of a Holliday junction (HJ) by XerD

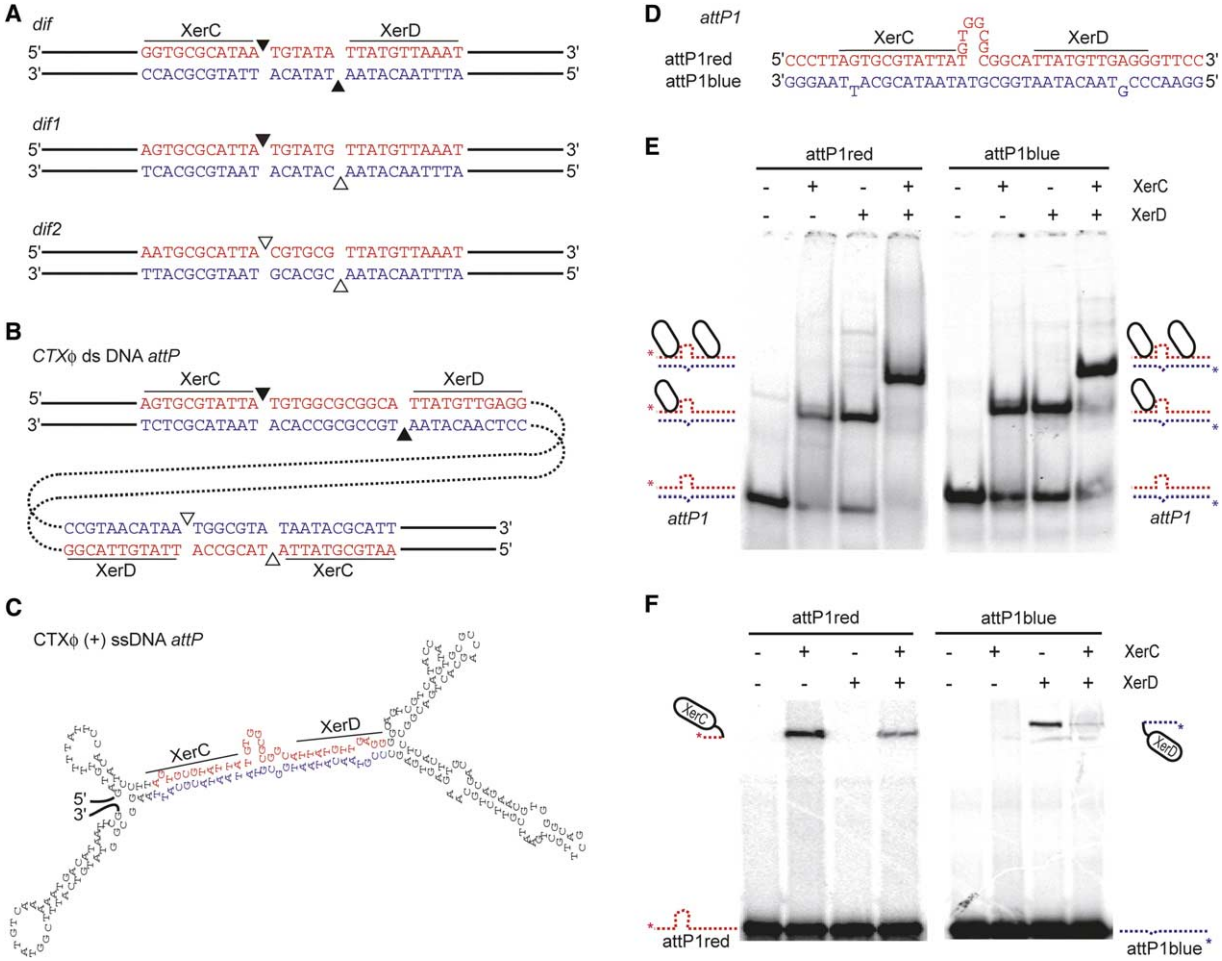


Figure 1. In Vitro Binding and Cleavage of *attP* (+) ssDNA by XerC and XerD

Xer binding sites are indicated as an upper line; strands that have been shown to be or are expected to be attacked by XerC and/or XerD are shown in red and blue, respectively. Positions of strand cleavage are indicated with triangles; filled triangles indicate experimentally determined cleavage sites, while open triangles correspond to presumed sites.

(A) *E. coli dif* site and its *V. cholerae* counterparts *dif*1 and *dif*2. A *dif* site consists of two XerC and XerD binding sites separated by a 6 bp central region.

(B) Sequence of the double-stranded *att*P region of CTXϕ replicative form. The two inverted *dif*-like sequences are connected by a 90 bp DNA sequence indicated as a dotted line.

(C) The *attP* region of the (+) ssDNA of CTXϕ, which is normally packaged in phage particles, can adopt a forked hairpin structure.

(D) Scheme of *attP1*, a synthetic probe mimicking the stem of the *attP* (+) ssDNA hairpin.

(E) Gel retardation analysis using nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis demonstrates that the *E. coli* XerC and XerD are able to bind to *attP1*. Two types of complexes are observed, corresponding to either one or two bound Xer recombinases. The nature of each complex is indicated beside the gel.

(F) In vitro covalent complex formation between the Xer recombinases and the red or blue strands of *attP1* were detected using a 12% PAGE-SDS after heat denaturation of the samples. 5′ labeling of attP1red reveals XerC-covalent binding while 5′ labeling of attP1blue reveals XerD-covalent binding. A scheme of the products is shown beside the gel.

catalysis (Aussel et al., 2002). This HJ is resolved into product by XerC catalysis. In the absence of FtsK, XerC catalysis directs a nonproductive recombination event that generates a HJ that is recycled back to original substrate by XerC (Barre et al., 2000).

In *Vibrio cholerae* El Tor strains, it is *dif1* that is targeted by CTXϕ (Huber and Waldor, 2002). Integration requires XerCD, but not their cell division partner FtsK, and is not reversible (Huber and Waldor, 2002). A putative integration site on the phage dsDNA replicative genome, *attP*, was tentatively defined by comparison of the sequences of the integrated prophage and of the replicative form (Figure 1B) (Huber and Waldor, 2002). Its deletion leads to loss of integration (Huber and Waldor, 2002). XerCD recombinases can bind and cleave this site (McLeod and Waldor, 2004). Another *dif*-like site on the dsDNA genome of the phage has been identified 90 bp away from *attP* (Figure 1B) (McLeod and Waldor, 2004). This second site was shown to be required for integration and was attributed an architectural role in the formation of the integrative synapse (McLeod and Waldor, 2004). However, this model raised several questions (Blakely, 2004). What is the exact role of the second "architectural" binding site? Why is the

reaction irreversible? The recombinase binding sites are separated by 12 bp in the putative *attP* dsDNA site whereas this distance should be 6–8 bp to allow for the interactions between XerC and XerD that control synapse formation and catalysis. How could the Xer recombinases contact each other in *cis* on such a substrate?

Here, we show that CTXϕ integration directly uses the (+) ssDNA genome of the phage as a substrate. The two *dif*-like sequences present on the (+) ssDNA genome and the 90 bp sequence separating them fold into a double-forked hairpin, which unmasks a new Xer recombination site. We show that XerCD can recombine this target with *dif1* and *dif*. Only one strand exchange is performed. It is mediated by XerC catalysis. This new integration strategy explains the complex structure of the integration region found on the replicative form of the phage. It also explains why the prophage cannot be excised from its host genome, as expected from in vivo observations.

Results

The Folded Structure of *attP* (+) ssDNA Reveals a New *dif*-like Site

In the replicative form of the phage, the *attP* region contains two pairs of binding sites for XerC and XerD. Exchanges occur in one of them; the other one, distant by 90 bp, has been proposed to play an architectural role (McLeod and Waldor, 2004). The two sites are in inverse orientations. We have found that the DNA separating them has palindromic features, so that this region could fold into a forked hairpin structure in the (+) ssDNA genome of the phage (Figure 1C, *attP* (+) ssDNA). The stem of this structure resembles a *dif* site with a bulge in the central region. We therefore tested if this stem can be recognized as a Xer site. The stem is mimicked by *attP1*, a probe obtained by annealing two synthetic oligonucleotides, attP1red and attP1blue (Figure 1D). *E. coli* XerC and XerD can independently bind to *attP1* as shown by gel retardation (Figure 1E). Binding is more efficient when XerC and XerD are added together, suggesting that the bulge of the probe does not impede the interactions between XerC and XerD that are involved in cooperative binding. Formation of a covalent complex between the recombinases and their target strand was then used to show that XerC and XerD can cleave *attP1* (Figure 1F). XerC cleaves the bulging strand of the stem and XerD cleaves the opposite strand (Figure 1F, attP1red and attP1blue, respectively). When both recombinases were bound to the stem, the efficiency of covalent complex formation diminished, as expected if XerC and XerD can contact each other and control their catalytic state despite the bulged structure of the central region (Hallet et al., 1999). Under these conditions, XerC cleavage was favored and accounted for 92% of covalent complex formation (Figure 1F). We then located the exact position of the XerC cleavage site by labeling the 3′ end of attP1red and comparing the migration of the oligonucleotide liberated after XerC cleavage with an oligonucleotide ladder (Figure 2). XerC was found to attack the DNA immediately 3′ to its binding site in *attP* (+) ssDNA, just like in *dif*.

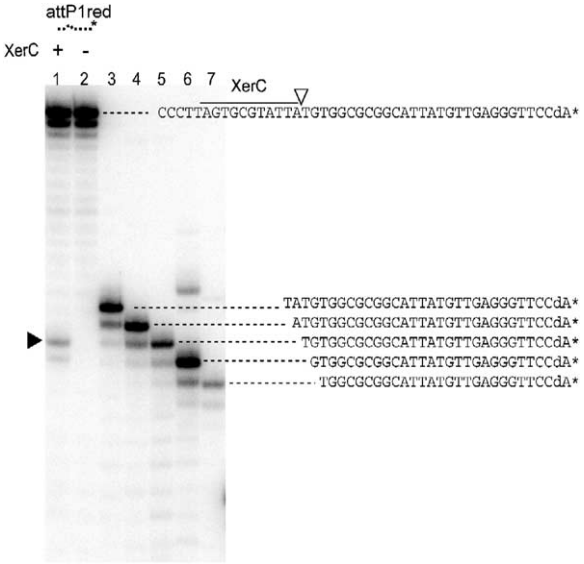


Figure 2. Cleavage Point of XerC on *attP1*

Upon cleavage, XerC forms a covalent complex with the 5′ end of attP1red, which liberates a shorter 3′ end fragment. AttP1red was 3′ labeled and the size of the liberated 3′ end fragment was analyzed on a 12% denaturing polyacrylamide gel. Lane 1: in vitro covalent complexes were generated by XerC-mediated cleavage in the absence of XerD to increase the efficiency of the reaction; lane 2: control in the absence of XerC; lane 3–7: 3′-labeled oligonucleotide ladder encompassing the length of the expected cleaved fragment (open triangle). The filled arrow indicates the cleaved product.

A Scheme for Single-Stranded DNA Integration

In Xer recombination, homology between the partner sites 3′ to the cleavage position of the recombinases is essential for strand exchanges to occur. The three nucleotides immediately 3′ to the XerC cleavage site are shared in *attP* (+) ssDNA, *dif1*, and *dif* (Figure 3, TGT trinucleotide on the red strands). One nucleotide is conserved at the same position on the opposite strands. XerC could therefore catalyze the exchange of a pair of strands between *attP* (+) ssDNA and *dif1* or *dif*. The outcome would be the integration of CTXϕ ssDNA into *dif1* or *dif*, which could then be transformed into dsDNA by cellular processes such as replication or gap repair similarly to what happens in Xer recombination between *cer* sites (Colloms et al., 1997; Colloms et al., 1996). The orientation of the integrated prophage and the sequence of its boundaries with the genome of the bacteria would fit with what has been observed in vivo in *V. cholerae* (Huber and Waldor, 2002) (Figure 3, *attL* and *attR*). The (–) strand of the phage genome, which is not normally packaged in viral particles, can also create a forked hairpin structure, but it lacks the necessary homology in its central region to promote integration.

In Vitro Recombination between *dif* and *attP* (+) ssDNA

To prove that the reaction scheme shown in Figure 3 is correct, circular ssDNA containing either the (+) or (–) ssDNA of *attP* was reacted in the presence of *E. coli* XerCD against a 34 bp *dif* probe obtained by annealing two synthetic oligonucleotides, difred and difblue, and

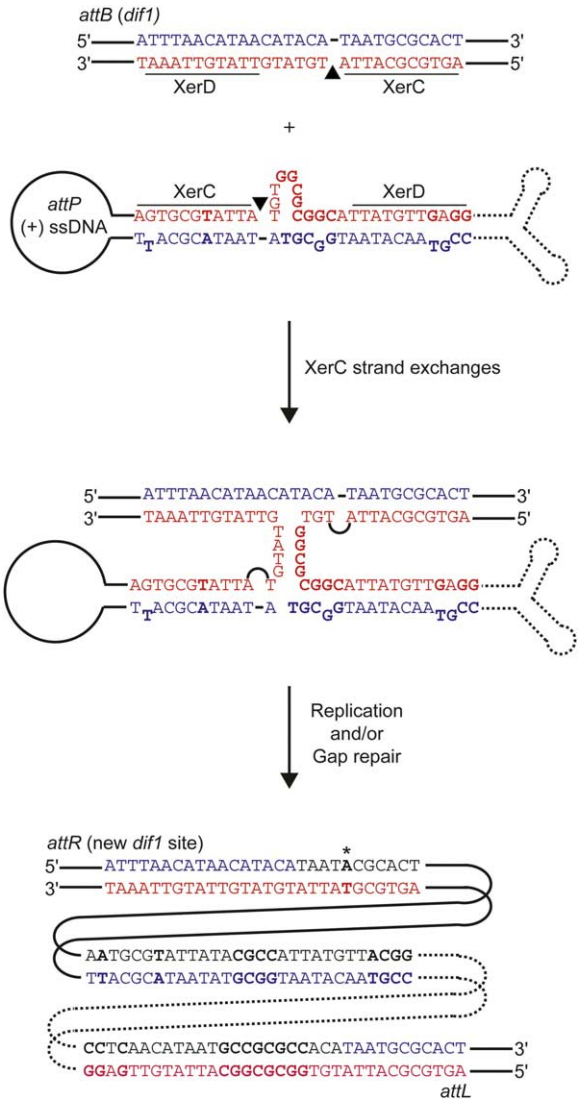


Figure 3. Scheme of the Proposed Recombination Reaction between *attP* (+) ssDNA and *V. cholerae dif1* (*attB*) that Would Result in Integration of the Phage

Bases in *attP* (+) ssDNA that differ from *dif1* are shown in bold type. Religation events after strand exchanges are represented with an arc. The reaction stops after a single pair of strand exchange catalyzed by XerC. The branched intermediate is then converted to dsDNA products by cellular processes, such as replication and/or gap repair (bases shown in black). The resulting CTXϕ prophage is flanked by two new sites, *attL* on the left and *attR* on the right. Integration of the phage disrupts *dif1*, but *attR*, which differs from *dif1* by a single base pair (shown by an asterisk), can function as a new chromosome dimer resolution site.

radioactively labeled (Figure 4A). Following recombination, the short *dif* probe and the longer recombination products were separated by agarose gel electrophoresis. As predicted in the scheme shown in Figure 3, integration was observed with *attP* (+) ssDNA but not with the (–) strand (Figure 4B).

Recombination between *dif1* and the XerCD target site contained within *attP* (+) ssDNA was also observed (data not shown). No recombination was observed between this target site and *dif2*, in which the T nucleotide immediately 3′ to the XerC cleavage site is replaced by a C that cannot pair properly during strand exchange (data not shown).

Integration Only Requires XerC Catalysis

To further confirm the model of Figure 3, recombination products between *attP* (+) ssDNA and *dif* were analyzed after denaturation. As shown in Figure 4C, only radioactivity carried by difred was transferred, demonstrating that the XerC strand of *dif* is exchanged but not the XerD strand. To prove that it is also the XerC strand of *attP* (+) ssDNA which is exchanged, we analyzed the recombination products obtained using the *attP1* probe (Figure 1D) and a supercoiled plasmid carrying *dif*. The attP1red oligonucleotide was labeled either on its 5′ end or on its 3′ end. The topology of the recombination product was tested under nondenaturing conditions and found to be relaxed (Figure 4D, n lanes). After denaturation, radioactivity stayed shifted (Figure 4D, d lanes). Taken together, these results suggested that recombination between *dif* and *attP* (+) ssDNA leads to the formation of a HJ and that only XerC catalysis is required during the process. This was confirmed using a catalytically inactive mutant of XerD, XerDYF, in which the catalytic tyrosine has been replaced by a phenylalanine (Figure 4E). However, no recombination was observed in the absence of XerD or XerDYF, suggesting a role for XerD in synapse formation and/or control of catalysis.

Correct Folding of *attP* (+) ssDNA Is Required for Integration

A crucial element of the integration strategy depicted in Figure 3 is that the ssDNA substrate of integration must fold into a stem-loop structure, creating a small region of duplex DNA that is the target of the site-specific recombinases. A complementary base change study was performed to prove this point. We created a mutant version of *attP1*, in which base substitutions that would impede the correct folding of the substrate (without altering catalysis and without altering DNA recognition by XerC or XerD) were introduced in the red oligonucleotide (Figure 4F, *attP2*). No base substitutions were performed in the central regions separating the Xer binding sites, which is likely to be involved in control of catalysis; the TT dinucleotide immediately 5′ of the XerC binding site was replaced by a AA dinucleotide; the GT dinucleotide immediately 3′ of the XerD binding site was replaced by a CC dinucleotide; a T nucleotide in the XerC binding site was replaced by a C to make it a perfect homolog of *dif1*; finally, the GAGG nucleotides at the end of the XerD binding site were replaced by the AAAT nucleotides present in *dif1*. Recombination between *dif* and *attP2* was suppressed (Figure 4F, *attP2*). However, when the complementary mutations were introduced in the blue oligonucleotide of the mutated probe, integration was recovered (Figure 4F, *attP3*). Finally, we did not observe recombination between *dif* and a probe in which the central bulge had been replaced by the 12 bp region found in the prophage, demonstrating the importance of the spacing

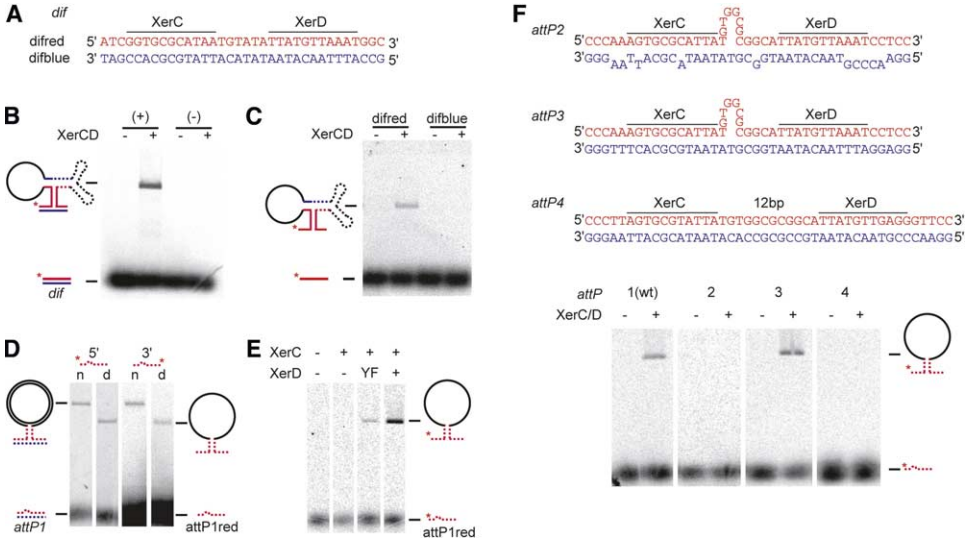


Figure 4. In Vitro Xer Recombination between the ssDNA *attP* Region of CTXϕ and *dif*

(A) Scheme of the *dif* probe used in (B) and (C).

(B) Xer-mediated recombination between *dif* and a circular ssDNA containing either the (+) or (–) strand CTXϕ *attP* region. The 5′ end of difred was radioactively labeled.

(C) Only the red strand of *dif* is exchanged with *attP* (+) ssDNA. Circular ssDNA containing *attP* (+) ssDNA was reacted with a *dif* probe, which was labeled on the 5′ end of difred or difblue. Samples were analyzed by agarose gel electrophoresis after denaturation.

(D) Integration of *attP1* into a *dif*-containing plasmid. attP1red was either 5′ or 3′ labeled. Products of recombination were analyzed by agarose gel electrophoresis under their native form (n) or after denaturation (d). Recombination products migrate at a position equivalent to linear ssDNA after denaturation or nicked circle on native conditions.

(E) Both recombinases are required for recombination between *attP1* and *dif*, but only the catalytic activity of XerC is necessary. The red strand of *attP1* was 5′ end-labeled. *attP1* was reacted with a *dif*-containing plasmid in the presence or absence of XerD and a XerD catalytic mutant (YF).

(F) Importance of the secondary structure of the *attP* (+) ssDNA for its integration into a *dif*-containing plasmid. Scheme of the different *attP* probes recombined with a *dif*-containing plasmid. The red strand of each probe was 5′ labeled.

between the recombinase binding sites (Figure 4F, *attP4*).

In Vivo Recombination between *dif* and *attP* (+) ssDNA

To prove that the *V. cholerae* recombinases can use *attP* (+) ssDNA to promote the integration of CTXϕ into *dif1* inside a bacteria, we created *E. coli* strains lacking XerCD or expressing in their place the *V. cholerae* orthologs, a strategy that had already been successful for the study of *H. influenzae* Xer recombination (Yates et al., 2003). *dif1* was cloned in a multicopy plasmid and introduced in these recipient strains. A dsDNA region of the prophage encompassing the *attP* site (starting 35 bp before the first XerC binding site and ending 44 bp after the second XerC binding site shown in Figure 1B) was cloned in both orientations in a conjugative vector that cannot be replicated in the recipient cells, so that either the (+) or (–) strand of *attP* would be transferred during conjugation depending on the orientation. After conjugation, the frequency of recombinants between the transferred *attP* ssDNA and the *dif1*-containing plasmid was assessed by plating on appropriate selective media. The specificity of integration into the target site was examined by PCR and by sequencing. As shown in Table 1, *attP* (+) ssDNA could be integrated into *dif1* by the action of the *V. cholerae* or the *E. coli* recombinases. Importantly, no specific integration was observed with *attP* (–) ssDNA, excluding the possibility that integration was due to the formation of a dsDNA intermediate after conjugation.

To demonstrate in vivo the importance of the folding of the *attP* region, we performed a base change complementation study. To achieve this, we cloned in the conjugative vector a shorter dsDNA region of the prophage around *attP* (*attP1*, starting 2 bp before the first XerC binding site and ending 4 bp after the second XerC binding site shown in Figure 1B) so that mutations could be easily introduced by PCR directed mutagenesis. We then created a vector carrying mutations equivalent to these of *attP2* and *attP3* (see Figure 4F). As predicted, no specific integration was observed using a conjugative vector carrying the *attP2* site, but integration was recovered with vectors carrying the *attP1* and *attP3* sites (Table 2).

Finally, specific integration of a vector carrying the *attP* (+) ssDNA could still be observed in a strain lacking XerD but expressing the catalytic XerDYF mutant, further demonstrating that only the catalytic activity of XerC is required for integration (Table 2).

Discussion

Single-Stranded DNA Integration

Mobile DNA elements and viruses often encode recombinases or make use of host recombination systems to

Table 1. Frequency of Integration of the (+) or (–) Strand of CTXϕ *attP* into a Plasmid-Borne *dif* Site

	Xer⁻-*dif1*		ViXerCD-*dif1*		EcXerCD-*dif1*	
CTXϕ	(+)	(–)	(+)	(–)	(+)	(–)
$f(\times 10^{-8})$	<6.5	<7.75	130	<10	1280	<3.5

Results are from three independent in vivo conjugation assays. The *E. coli* recipient strains were derived from a *recF, pir*, *xerC*::Gm^R (gentamycin) and *xerD*::Km^R (kanamycin) derivative of AB1157 (Xer$^-$) by introduction of the *E. coli* or *V. cholerae xer* genes in place of the *xerC*::Gm^R allele (EcXerCD and ViXerCD, respectively). The coding sequences of *V. cholerae* XerC and XerD were amplified by PCR from *V. cholerae* genomic DNA (serotype O1, El Tor N16961; TIGR). Constructs were verified by sequencing. A dsDNA region surrounding the *attP* site of CTXϕ (starting 35 bp before the first XerC binding site and ending 44 bp after the second XerC binding in Figure 1B) was cloned in both orientations on a conjugative vector. (+) and (–) symbols indicate the strand which is transferred during conjugation depending on this orientation.

integrate into the chromosomal DNA of their hosts as a method of promoting vertical transmission. The mobile form of the element or of the virus is not necessarily composed of double-stranded DNA (dsDNA), but can be RNA or single-stranded DNA (ssDNA). ssDNA forms have generally been considered to be converted into dsDNA prior to their integration. In contrast to these classical models, we have shown that Xer recombinases can promote the direct integration of the (+) ssDNA genome of CTXϕ into the *dif* site of *V. cholerae* chromosome 1, in a process that does not require conversion of ssDNA into dsDNA prior to integration. The key element of this new integration strategy is that the ssDNA substrate of integration can fold into a stem-loop structure, creating a small region of duplex DNA that is the target of the site-specific recombinases. Thus, the two *dif*-like sequences found in the replicative form of CTXϕ are but the complimentary strands of a unique recombinase binding site forming the stem of a forked hairpin structure. This explains why identical mutations are found in the XerC and XerD binding sites of these two sites, when compared to the "canonical" *dif1* site: mismatches in the stem of the forked hairpin would destabilize the folded structure. It also explains why the 90 bp segment separating the two *dif*-like sequences in the replicative form of the phage was found to be important for integration (McLeod and Waldor, 2004): interfering with the palindromes in this region risks destabilizing the folded structure.

Only One Pair of Strand Exchanges Is Performed

The ssDNA integration strategy also explains why only one pair of strand exchanges is performed (McLeod and Waldor, 2004) and why FtsK, which normally activates Xer recombination at *dif*, is not required for this reaction (Huber and Waldor, 2002). Two sequential pairs of strand exchanges by XerC and XerD would create an abortive structure, which would linearize the bacterial chromosome. Instead, Xer-dependent recombination between *attP* (+) ssDNA and *dif1* stops at the stage of HJ formation. This HJ is created by a single pair of strand exchanges due to XerC catalysis, the presence of the partner recombinase XerD being nevertheless necessary, certainly because of its role in synapse formation. The complex structure of *attP* (+) ssDNA is likely to participate in the control of catalysis by XerCD in this reaction, as shown by the absence of integration of an *attP* site carrying a 12 bp central region. Interestingly, the presence of a bulge between the two Flp binding sites in *frt*-like synthetic substrates is known to favor the attack of the bulging strand by the recombinases (Jayaram et al., 2002).

A requisite of the integration strategy of CTXϕ is that the HJ intermediate created by XerC catalysis is converted to dsDNA by cellular processes, as already hinted by careful comparison of the sequences of the integrated prophage and of the replicative form (McLeod and Waldor, 2004). A similar strategy has been adopted for ColE1-plasmid dimer resolution by XerCD recombination at *cer* (Colloms et al., 1996, 1997).

Integration Is Irreversible

An important feature of the life cycle of CTXϕ is that it cannot be excised from the genome of its host (Davis and Waldor, 2003). Instead, new replicative forms of the virus are created by rolling circle replication of tandemly repeated prophages (Moyer et al., 2001). This was paradoxical since DNA segments integrated between two *dif* sites at the normal chromosomal position are normally excised with a very high efficiency (Barre et al., 2000; Perals et al., 2000, 2001; Tecklenburg et al., 1995). This paradox is solved by the integration mechanism reported here: the true integration site, *attP* (+) ssDNA, is masked in the dsDNA prophage, and neither of the two *dif*-like sites of the prophage is a good candidate for an exchange reaction with *dif1* (Figure 5A). In

Table 2. Frequency of Integration of Different *attP* Variants into a Plasmid-Borne *dif* Site

XerD	wt	wt	wt	wt	wt	YF
attP	(+)	(–)	1	2	3	(+)
$f(\times 10^{-8})$	1640	<2.76	230	<2.12	588	10.7

Results are from at least two independent in vivo conjugation assays. The *E. coli* recipient strain was created by P1 transduction of the *xerD*::Km^R allele of strain DS9008 into an F-derivative of TG1. It carried a multicopy vector containing *dif1*, a copy of the *E. coli xerC* gene, and a copy of the *E. coli xerD* (wt) or *xerDYF* (YF) gene tandemly expressed from the *xerC* promoter. (+) and (–): as in Table 1. 1: *attP1*, a shorter region surrounding *attP* (starting 2 bp before the first XerC binding site and ending 4 bp after the second XerC binding in Figure 1B) transferred in the (+) orientation; 2 and 3: *attP2* and *3* variant sites (see Figure 4F) transferred in the (+) orientation.

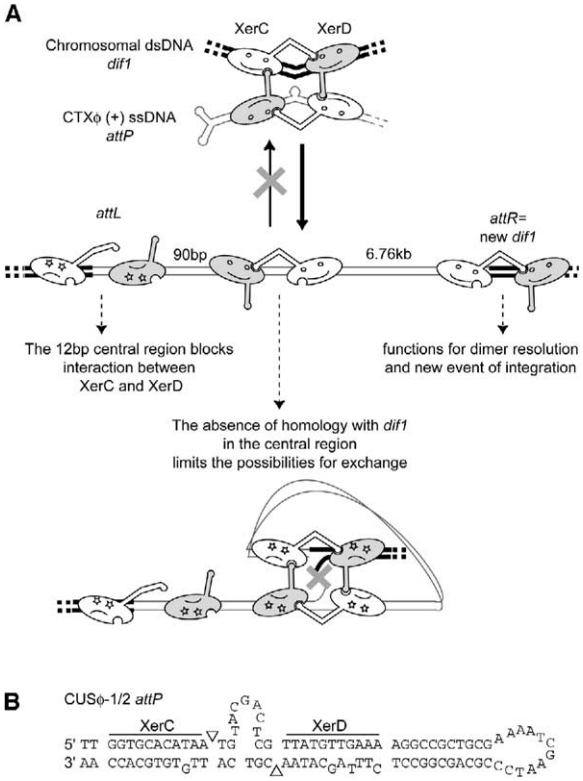


Figure 5. A Strategy for Integration Using Single-Stranded DNA

(A) Scheme depicting how CTXϕ (+) ssDNA can be integrated into *dif1* using *attP* (+) ssDNA, and how this site is masked in the dsDNA *attL* and *attR* regions of the prophage. Chromosomal DNA is shown in bold, phage DNA in light gray. XerC and XerD are represented as white and gray figures, respectively. Recombination reactions are drawn as if viewed from the C-terminal side of the recombinases to show the C-terminal interactions that control XerCD catalysis.

(B) The (+) ssDNA of the *attP* region of *E. coli* CUSϕ-1 and *Y. pestis* CUSϕ-2 can fold into a hairpin, which creates a target for recombination by XerC and XerD similar to CTXϕ *attP* (+) ssDNA.

one sequence, the central region contains sufficient homology with *dif1* to allow for strand exchanges, but the recombinase binding sites are separated by 12 bp whereas this distance should be 6–8 bp to allow for the interactions between XerC and XerD that control their catalysis (Hallet et al., 1999). In the other sequence, the 7 bp central region should allow the XerCD recombinases to interact together, but it lacks any homology with the central region of *dif1*, which limits possibilities for strand exchange. Thus, the necessity to leave no functional Xer sites in the integrated prophage could explain why such an integration system has evolved.

Single-Stranded DNA Integration Could Be a Widespread Strategy

An advantage of the integration mechanism of CTXϕ is that it can be achieved in the genome of any bacteria encoding a sufficiently similar Xer recombination system, as shown here with the *E. coli* and *V. cholerae* systems. Consistently, we found two prophages, CUSϕ-1 and -2, carrying the same *attP* region with necessary features for direct ssDNA integration into *dif* (Figure 5B), and respectively integrated in the genome of pathogenic isolates of *E. coli* that are responsible for meningitis and in the genome of *Yersinia pestis* (Gonzalez et al., 2002).

A secondary structure formed by ssDNA could also be the substrate for recombination reactions of mobile DNA elements that do not use XerCD. Indeed, the class I integron integrase IntI1, which catalyzes the integration of gene cassettes bordered by *attC* sites into *attI* sites, preferentially binds single-stranded *attC* sites (Francia et al., 1999; Johansson et al., 2004), and in vivo data strongly support an insertion model that only involves one strand of *attC* under stem and loop structure (M.B., G. Demarre, and D. Mazel, submitted). Finally, it is tempting to speculate that other mobile DNA elements could have adopted an integration strategy based on ssDNA. This could be the case for some of the various genetic elements gathered in the conjugative transposon family, for which ssDNA is part of the natural life cycle, with necessary consequences for our understanding of horizontal gene transfer and for the analysis of genomes in general.

Experimental Procedures

Proteins and In Vitro Substrates

dif, *dif1*, and *attP* short synthetic substrates were obtained by annealing complementary oligonucleotides that were purified by PAGE. T4 DNA polynucleotide kinase and [γ-^{33}P]ATP were used for 5′ end labeling of oligonucleotides. Terminal transferase and [α-^{32}P] ddATP were used for 3′ end labeling.

For in vitro purification of circular ssDNA, a region surrounding the *attP* site of CTXϕ was amplified by PCR from *V. cholerae* genomic DNA (serotype O1, El Tor N16961; TIGR) and cloned in two orientations on pSW24, a suicide vector from the R6K based pSW family (Demarre et al., 2005). Constructs were verified by sequencing. Circular ssDNA was then purified from phages obtained in cultures of β2150, which is pir$^+$ and contains an integrated F, carrying the cognate vector and infected by the helper phage M13KO7 (Demarre et al., 2005). The *E. coli* wild-type XerC and XerD recombinases were purified as described elsewhere (Colloms et al., 1996). The catalytically inactive mutant of *E. coli* XerD, XerDYF, was tagged on its N-terminal domain with six histidines and cloned into a pET vector. It was expressed in B834 (DE3) pLysS cells (Novagen), purified on a nickel column (Ni-NTA, Qiagen) and a heparin column (Hi-Trap, Pharmacia). His-tagged versions of *E. coli* XerC and XerD behaved like wild-type recombinases (data not shown). Constructs were verified by sequencing.

Gel Retardation and In Vitro Covalent Formation Assays

Binding of recombinases to DNA probes was performed in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 μg of BSA, 40% glycerol and 0.2 pmol of radiolabeled probe in a final volume of 20 μl. After 10 min of incubation at 37°C, half of the reaction was electrophoresed through 7% polyacrylamide in 1× TBE buffer at 4°C for gel retardation assay. After 2 hr at 37°C, the remainder of the reaction was treated with 1× of SDS loading buffer (Biolabs), 30 mM DTT and then denatured by heating at 100°C for 3 min. The covalent complexes were analyzed by SDS-PAGE (12%). Radioactive bands were detected with a phosphor screen (Fujifilm, BAS-1000). Quantitation was performed using Image Gauge software (Science Lab).

In Vitro Strand Exchange Assay

Multicopy plasmids carrying *dif1* and *dif2,* which were obtained by annealing complementary oligonucleotides and cloning them in place of the *dif* site of plasmid pFX316 (Massey et al., 2004), were used for recombination assays with the different *attP* synthetic

probes. Constructs were verified by sequencing. Circular ssDNA containing either the (+) or (–) strand of the *attP* region of CTXϕ was used for recombination with *dif* and *dif1* probes. Standard reactions contained 100 ng of the cold substrate, 0.2 pmol of the ^{33}P-labeled probe, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 μg BSA, and 40% glycerol in a volume of 10 μl. Reactions were incubated for 2 hr at 37°C before addition of SDS and proteinase K to final concentrations of 0.5% and 0.4 mg/ml, respectively, followed by electrophoresis through 1% agarose in 1× TAE. Gels were subsequently stained with SybrGreen (FMC Biotools), scanned using a Fluorimager imaging system (Molecular Dynamics). Radioactivity was detected with a phosphor screen (Fujifilm, BAS-1000).

In Vivo Integration Assay

For conjugation, *attP* sites were cloned in two orientations on pSW23T, a suicide vector from the R6K-based pSW family (Demarre et al., 2005). Constructs were verified by sequencing. Conjugations were performed as previously described (Biskri et al., 2004). Briefly, recipient cells were derivatives of AB1157 or TG1. The donor strain was β2163. It carries an RP4 integrated in its chromosome and requires addition of DAP to grow in rich medium and sustain pSW replication through the expression of a pir gene integrated in the chromosome. Substrates were delivered in the recipient cells using the RP4 (IncPα) conjugation system. As pSW replication absolutely requires the Π protein, the number of recipients expressing the pSW marker directly reflects the frequency of cointegrate formation between the delivered DNA and the recipient cell endogenous replicons. Cointegrate formation was checked by PCR with appropriate primers on randomly chosen clones for each experiment.

Acknowledgments

We thank Eriel Marinez, Dr. A. Dziembowski, Dr. V. Regnier, Dr. B. Hallet, Dr. M. Grigoriev, and Dr. M. Chandler for helpful discussions. M.-E.V. and M.B. were supported by a CNRS and a MENESR studentship, respectively. Work in Gif sur Yvette and Toulouse was supported by a grant from the CNRS ATIP program. Gif-Pasteur and Gif-Oxford collaborations were supported by a grant in fundamental microbiology from the MENESR ACI program and a Joint Project grant from the Royal Society, respectively.

Received: February 28, 2005
Revised: May 31, 2005
Accepted: July 5, 2005
Published: August 18, 2005

References

Aussel, L., Barre, F.X., Aroyo, M., Stasiak, A., Stasiak, A.Z., and Sherratt, D. (2002). FtsK is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. Cell *108*, 195–205.

Barre, F.X., Aroyo, M., Colloms, S.D., Helfrich, A., Cornet, F., and Sherratt, D.J. (2000). FtsK functions in the processing of a Holliday junction intermediate during bacterial chromosome segregation. Genes Dev. *14*, 2976–2988.

Bigot, S., Corre, J., Louarn, J., Cornet, F., and Barre, F.X. (2004). FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein. Mol. Microbiol. *54*, 876–886.

Biskri, L., Bouvier, M., Guerout, A.M., Boisnard, S., and Mazel, D. (2004). Comparative study of the class 1 integron and Vibrio cholerae superintegron integrase activities. J. Bacteriol. *187*, 1740–1750.

Blakely, G.W. (2004). Smarter than the average phage. Mol. Microbiol. *54*, 851–854.

Colloms, S.D., Bath, J., and Sherratt, D.J. (1997). Topological selectivity in Xer site-specific recombination. Cell *88*, 855–864.

Colloms, S.D., McCulloch, R., Grant, K., Neilson, L., and Sherratt, D.J. (1996). Xer-mediated site-specific recombination *in vitro*. EMBO J. *15*, 1172–1181.

Cornet, F., Hallet, B., and Sherratt, D.J. (1997). Xer recombination in *Escherichia coli*. Site-specific DNA topoisomerase activity of the XerC and XerD recombinases. J. Biol. Chem. *272*, 21927–21931.

Davis, B.M., and Waldor, M.K. (2003). Filamentous phages linked to virulence of Vibrio cholerae. Curr. Opin. Microbiol. *6*, 35–42.

Demarre, G., Guerout, A.M., Matsumoto-Mashimo, C., Rowe-Magnus, D.A., Marlière, P., and Mazel, D. (2005). A new family of mobilizable suicide plasmids based on the broad host range R388 plasmid (IncW) or RP4 plasmid (IncPa) conjugative machineries and their cognate E.coli host strains. Res. Microbiol., in press.

Francia, M.V., Zabala, J.C., de la Cruz, F., and Garcia Lobo, J.M. (1999). The IntI1 integron integrase preferentially binds single-stranded DNA of the attC site. J. Bacteriol. *181*, 6844–6849.

Gonzalez, M.D., Lichtensteiger, C.A., Caughlan, R., and Vimr, E.R. (2002). Conserved filamentous prophage in Escherichia coli O18:K1:H7 and Yersinia pestis biovar orientalis. J. Bacteriol. *184*, 6050–6055.

Hallet, B., Arciszewska, L.K., and Sherratt, D.J. (1999). Reciprocal control of catalysis by the tyrosine recombinases XerC and XerD: an enzymatic switch in site-specific recombination. Mol. Cell *4*, 949–959.

Huber, K.E., and Waldor, M.K. (2002). Filamentous phage integration requires the host recombinases XerC and XerD. Nature *417*, 656–659.

Jayaram, M., Grainge, I., and Tribble, G. (2002). Site-Specific Recombination by the Flp Protein of Saccharomyces cerevisiae. In Mobile DNA II, N.L. Craig, R. Craigie, M. Gellert, and A. Lambowitz, eds. (Washington: ASM Press), pp. 192–218.

Johansson, C., Kamali-Moghaddam, M., and Sundstrom, L. (2004). Integron integrase binds to bulged hairpin DNA. Nucleic Acids Res. *32*, 4033–4043.

Lesterlin, C., Barre, F.X., and Cornet, F. (2004). Genetic recombination and the cell cycle: what we have learned from chromosome dimers. Mol. Microbiol. *54*, 1151–1160.

Massey, T.H., Aussel, L., Barre, F.-X., and Sherratt, D.J. (2004). Asymmetric activation of Xer site-specific recombination by FtsK. EMBO Rep. *5*, 399–404.

McLeod, S.M., and Waldor, M.K. (2004). Characterization of XerC- and XerD-dependent CTX phage integration in Vibrio cholerae. Mol. Microbiol. *54*, 935–947.

Moyer, K.E., Kimsey, H.H., and Waldor, M.K. (2001). Evidence for a rolling-circle mechanism of phage DNA synthesis from both replicative and integrated forms of CTXphi. Mol. Microbiol. *41*, 311–323.

Perals, K., Capiaux, H., Vincourt, J.B., Louarn, J.M., Sherratt, D.J., and Cornet, F. (2001). Interplay between recombination, cell division and chromosome structure during chromosome dimer resolution in Escherichia coli. Mol. Microbiol. *39*, 904–913.

Perals, K., Cornet, F., Merlet, Y., Delon, I., and Louarn, J.M. (2000). Functional polarization of the *Escherichia coli* chromosome terminus: the *dif* site acts in chromosome dimer resolution only when located between long stretches of opposite polarity. Mol. Microbiol. *36*, 33–43.

Tecklenburg, M., Naumer, A., Nagappan, O., and Kuempel, P. (1995). The *dif* resolvase locus of the *Escherichia coli* chromosome can be replaced by a 33-bp sequence, but function depends on location. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *92*, 1352–1356.

Yates, J., Aroyo, M., Sherratt, D.J., and Barre, F.X. (2003). Species specificity in the activation of Xer recombination at dif by FtsK. Mol. Microbiol. *49*, 241–249.

II. Résultats soumis pour publication :

FTSK-DEPENDENT
DIMER RESOLUTION ON MULTIPLE CHROMOSOMES
IN THE PATHOGEN *VIBRIO CHOLERAE*

Nous avons choisi d'étudier le système de résolution des dimères de chromosomes chez *V. cholerae* car il doit faire face dans cet organisme à un degré de complexité plus élevé pour assurer la ségrégation de deux chromosomes. D'autres bactéries possèdent un génome multipartite et pourrait se prêter à cette étude, cependant *V. cholerae* s'est trouvé être un bon candidat du fait de la disponibilité de la séquence de son génome (Heidelberg et al., 2000), des outils génétiques mis en place et du nombre important de laboratoires s'intéressant à la ségrégation des chromosomes dans ce pathogène, augmentant ainsi la quantité d'informations disponibles. Ces informations révèlent d'ailleurs que tous les systèmes de maintenance étudiés à ce jour chez cet organisme sont spécifiques de chaque chromosome (Egan et al., 2005, Srivastava & Chattoraj, 2007, Yamaichi et al., 2007).

A première vue le système Xer semble être commun aux deux chromosomes. En effet, un seul couple de recombinases XerC/D est codé sur le génome de *V. cholerae* et deux sites de fixation des recombinases, *dif*1 et *dif*2, sont localisés à la jonction des réplichores des chromosomes I et II respectivement. Les recombinases XerC/D d'*E. coli* sont aussi capables de gérer la résolution des multimères de plusieurs réplicons mais elle n'agissent que sur un seul chromosome. D'ailleurs nous avons vu que les voies catalytiques qu'elles empruntent ne sont pas les mêmes selon la nature

du site, plasmidique ou chromosomique (Aussel et al., 2002). La résolution des dimères de chromosome est liée au cycle cellulaire par la protéine FtsK alors que celle des plasmides ne l'est pas. Chez *E. coli*, la recombinaison à *dif* sur le chromosome est initiée par la recombinase XerD sous la dépendance de la protéine septale FtsK alors que la recombinaison aux sites plasmidiques *psi* et *cer* est initiée par XerC sous la dépendance d'autres protéines accessoires PepA, ArcA et ArgR. Chez *V. cholerae*, le site *dif*1 est conforme aux autres sites des γ-protéobactéries à simple chromosome, tandis que le site *dif*2 possède une région centrale dégénérée par rapport au site *dif* consensus. Les sites plasmidiques présentent également une dégénérescence de la région centrale. Cette observation ajoutée aux données conjecturant une origine plasmidique du chromosome II, nous a conduit à investiguer le mécanisme de résolution des dimères du petit chromosome et ses conséquences dans la gestion des deux chromosomes.

II.1. La résolution des dimères de chromosomes chez *V. cholerae*

La délétion du gène *xer*C de *V. cholerae* m'a permis de déterminer par compétition de croissance la quantité totale de dimères de chromosomes formés à 8,6% par cellule par génération. En supprimant *dif*1 ou *dif*2, on peut quantifier individuellement les taux de dimères formés par chaque chromosome. Ceux-ci sont de 5,8% pour le chromosome I (2,96 Mpb) et de 3% pour le chromosome II (1,07Mpb). Le défaut de croissance du mutant *xer*C est entièrement expliqué par le défaut de croissance des mutants Δ*dif*1 et Δ*dif*2, ce qui suggère que la formation des dimères des deux chromosomes est un évènement indépendant. L'inactivation de RecA dans ces différents mutants supprime leur défaut de croissance, ce qui confirme le rôle de XerC, *dif*1 et *dif*2 dans la résolution des dimères de chromosomes chez *V. cholerae*.

Le taux de formation de dimères chez *E. coli* qui a un chromosome de 4,6 Mpb est de 15,6%, ce qui tend à montrer que le taux de formation de dimères augmente avec la taille du réplicon. Si l'on reporte les trois seules valeurs expérimentales connues des taux de formation de dimères de chromosomes par rapport à la taille des chromosomes, on observe que le taux de formation de dimères augmente exponentiellement avec la taille des réplicons (Figure 51). En se basant sur cette exponentielle, le taux de formation de dimères si *V. cholerae* avait un seul chromosome de 4,03 Mpb (2,96 Mpb + 1,07 Mpb) serait de 11%. Au lieu de ça, il a été mesuré à 8,6% avec deux chromosomes distincts ce qui suggère qu'il y a un avantage topologique à conserver deux petit chromosomes au lieu d'un grand pour la résolution des dimères.

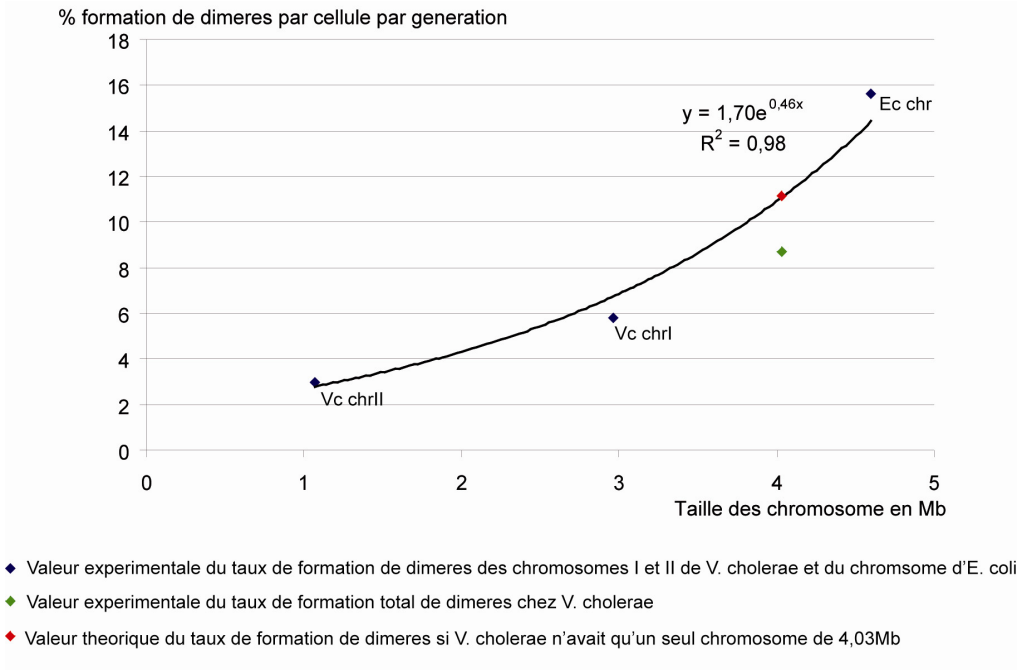


Figure 51. Avantage topologique des génomes multipartite
Le taux de formation de dimères de chromosomes par cellule par génération est reporté en fonction de la taille des chromosomes en Mpb. Les valeurs expérimentales en bleues servent à déterminer la courbe de régression dont l'équation définie une exponentielle ($y=1,70e^{0,46x}$). La valeur expérimentale en vert et la valeur théorique en rouge sont indiqués sur le graphe à titre indicatif.

II.2. Le mode de clivage des recombinases XerC/D de *V. cholerae* est conforme au paradigme d'*E. coli*

Chez *V. cholerae*, XerC coupe le brin Top et XerD coupe le brin Bottom des deux sites de recombinaison *dif*1 et *dif*2, ce qui était attendu d'après le mode de coupure des recombinases XerC/D chez *E. coli* et *B. subtilis* (Blakely et al., 1997, Sciochetti et al., 2001). Par ailleurs, elles coupent le site de recombinaison en *cis* à la jonction entre leur site de fixation et la région centrale, générant des extrémités 5'OH libres conformément au mécanisme connu de clivage des recombinases à tyrosine (Nunes-Duby *et al.*, 1987, Blakely et al., 1997).

II.3. Un mécanisme commun de résolution des dimères

Nos résultats démontrent que la recombinaison à *dif*1 et *dif*2 suit une même voie catalytique dépendante de la protéine septale FtsK et que dans les deux cas, XerD catalyse le premier échange de brin. Ce mécanisme commun de maintenance des deux chromosomes chez *V. cholerae* est intriguant car d'une part il implique que les mêmes recombinases agissent pareillement et avec la même efficacité sur deux sites différents et d'autre part il implique que la résolution des dimères des deux chromosomes soit coordonnée au cycle cellulaire alors que les deux chromosomes ont des chorégraphies de ségrégation différentes.

II.4. Co-évolution du système XerC/D, *dif*1/*dif*2 et FtsK de *V. cholerae* pour garder un système contrôlé de la résolution des dimères de chromosomes.

L'étude des spécificités d'espèce entre les systèmes Xer/FtsK de *E. coli* et de *V. cholerae*, a permis de mettre en évidence une co-évolution chez *V. cholerae* des

recombinases XerC/D avec la protéine FtsK afin d'agir avec la même efficacité et de manière régulée dans la résolution des dimères de chromosomes. En effet, les recombinases de *V. cholerae* fonctionnent avec une bonne efficacité sur les deux sites *dif*1 et *dif*2 en présence de leur propre partenaire $FtsK^{Vc}$. Si on échange $FtsK^{Vc}$ avec celle d'*E. coli*, $FtsK^{Ec}$, la recombinaison à *dif*2 par les recombinases de *V. cholerae* n'est pas aussi efficace. Par ailleurs, les recombinases de *V. cholerae* fonctionnent plus efficacement sur le site *dif*2 que celle d'*E. coli* même si celles-ci sont activées par leur propre partenaire, $FtsK^{Ec}$. Cette bonne efficacité des recombinases de *V. cholerae* à recombiner le site *dif*2 est contrebalancé par une légère perte du contrôle de FtsK sur les recombinases de *V. cholerae* à *dif*1. Cette perte du contrôle exercée par FtsK sur les recombinases de *V. cholerae* devient très élevée au site d'*E. coli*, dif^{Ec}. Ceci suppose que non seulement les partenaires Xer/FtsK ont co-évolués mais aussi les sites *dif*1 et *dif*2. Les déterminants nucléotidiques engagés dans le contrôle des recombinases montre qu'une guanine de la région centrale est très importante à *dif*1 et qu'une thymine conservée sur le site de fixation de XerC a un effet modéré mais significatif sur le contrôle des recombinases à *dif*1 et *dif*2.

II.5. La présence de deux sites différents de résolution de dimères permet d'empêcher les évènements de recombinaison entre chromosomes non-homologue.

Nous venons de voir que l'ajout d'un site *dif* supplémentaire augmente la complexité de la régulation de la recombinaison Xer/FtsK. Ils sembleraient cependant que malgré ce fardeau, la plupart des bactéries à génome multipartite aient choisi de garder des sites *dif* dont la région centrale diverge. Nous avons investigué dans ce

sens afin de savoir quelles sont les conséquences d'une harmonisation des sites *dif* sur les deux chromosomes. Nous montrons que l'absence d'homologie dans la région d'échange des deux sites permet d'empêcher leur recombinaison mutuelle qui pourrait conduire à la formation transitoire de chromosomes hybrides I-II.

II.6. FtsK^{Vc} reconnait des séquences polaires KOPS pour transloquer l'ADN de manière orientée

Des séquences de type KOPS sont retrouvées polarisées de l'origine vers le site *dif* sur les deux chromosomes. De plus FtsK^{Vc} est capable de reconnaitre des séquences KOPS 5'-GGGCAGGG-3' qui ont un impact direct sur son efficacité d'activation de la recombinaison. Finalement, FtsK^{Vc} est un homologue fonctionnel de FtsK^{Ec}, ce qui signifie qu'elle peut assurer chez *E. coli*, la double fonction de rapprochement des sites *dif* par translocation polarisée de l'ADN et activation de la recombinaison. L'ensemble de ces résultats ajoutés au fait que FtsK contrôle la recombinaison à *dif*1 et *dif*2, suggère fortement que chez *V. cholerae*, FtsK^{Vc} doit posséder un rôle similaire de mobilisation des sites *dif*1 et *dif*2 au septum afin d'activer la résolution des dimères. Il a été montré chez *E. coli*, que la résolution des dimères de chromosomes est retardée jusqu'à la fermeture du septum où FtsK devient active (Kennedy et al., 2008). Ceci suggère que la résolution des dimères des deux chromosomes doit être quasi synchrone en fin de cycle cellulaire. Nos résultats s'accordent avec cette hypothèse, puisque lorsqu'on harmonise les deux sites *dif* des chromosomes I et II, on observe des évènements de recombinaison entre ces deux sites ce qui suggère qu'ils peuvent se rapprocher pour former une synapse de recombinaison.

II.7. Nature du petit chromosome à travers son système de résolution des dimères

Bien que de nombreux indices suggèrent que le chromosome II dérive d'un plasmide, son statut chromosomique actuel est solide, du fait de sa grande taille (Okada et al., 2005) et de la présence de gène essentiels (Heidelberg et al., 2000). On sait aussi que la réplication des deux chromosomes est coordonnée au cycle cellulaire (Egan et al., 2004, Rasmussen et al., 2007). Cependant les causes de cette coordination de la réplication restent inconnues. La différence des systèmes de réplication des deux chromosomes suggèrent que ces mécanismes sont distincts pour ces deux chromosomes (Egan & Waldor, 2003, Duigou et al., 2006) ce qui est très différent de la situation retrouvée chez les eucaryotes. Ici nous réaffirmons le statut chromosomique du chromosome II en montrant que le système de résolution des dimères des deux chromosomes est synchronisé au cycle cellulaire par la protéine FtsK.

Article soumis pour publication :

FtsK-dependent dimer resolution on multiple chromosomes in the pathogen *Vibrio cholerae*

Marie-Eve Val[1,2,3], Sean P Kennedy[1,2,3], Meriem El Karoui[4], Laetitia Bonné[1,2,3], Fabien Chevalier[1,2,3] and François-Xavier Barre[1,2,3,*]

[1] CNRS, Centre de Génétique Moléculaire, UPR 2167, 91198 Gif-sur-Yvette, France
[2] Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France
[3] Université Pierre et Marie Curie- Paris 6, 75005 Paris, France
[4] INRA, UBLO, UR888, bat. 222, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en Josas, France

Abstract

Vibrio cholerae, the causative agent of cholera, harbors two circular chromosomes with distinct partition and replication initiation systems. These of the second chromosome are plasmid-like, which raised questions on its origin and/or chromosomal nature. Maintenance of circular replicons requires the resolution of dimers created by homologous recombination events. Here, we show that the same FtsK-dependent Xer recombination pathway ensures dimer resolution of the two *V. cholerae* chromosomes. This is the first example of a *bona fide* chromosomal process for the management of the second chromosome. The two chromosomes of *V. cholerae* N16961 strain carry different dimer resolution sites, *dif*1 and *dif*2, which are the target for a common pair of tyrosine recombinases, XerC and XerD. We further show that *V. cholerae* XerC, XerD and FtsK have co-evolved to maintain efficient and regulated recombination at these two divergent sites. Finally, we provide evidence that divergence of resolution sites in multipartite genomes likely serves to avoid the generation of non-homologous chromosome hybrids.

Introduction

Vibrio cholerae, the causative agent of cholera, harbors two circular chromosomes (Heidelberg et al., 2000). The preferential transcription of genes from chromosome II during colon colonization (Xu et al., 2003) suggests that this genomic organization is important for pathogenicity. Likewise, other bacteria with multiple chromosomes can adopt several different life cycles (Casjens, 1998), which led to the idea that multipartite genomes offer a selective advantage for the adaptation to very different environmental conditions.

Nevertheless, most bacteria harbor a single chromosome. In contrast, there is no apparent limit to the size and numbers of chromosomes harbored by eukaryotic cells. An important difference between bacteria and eukaryotes is that the same machineries coordinate chromosomal maintenance processes for all the chromosomes of a given eukaryotic cell whereas specific machineries exist for each chromosome of a given bacterium (Yamaichi et al., 2007, Srivastava & Chattoraj, 2007, Rasmussen et al., 2007, Fogel & Waldor, 2006, Egan & Waldor, 2003, Duigou et al., 2006, Dubarry *et al.*, 2006, Srivastava et al., 2006, Fogel & Waldor, 2005). For instance, the two *V. cholerae* chromosomes harbor different partition systems (Yamaichi et al., 2007, Fogel & Waldor, 2006) and initiation of their replication is governed by different mechanisms (Egan & Waldor, 2003, Duigou et al., 2006, Rasmussen et al., 2007). In addition, the replication initiation and partition systems of *V. cholerae* chromosome II were found to be closely related to plasmid systems, which raised questions on the origin and/or the chromosomal nature of this replicon.

A second major difference between bacteria and eukaryotes is intrinsic to the structure of chromosomes: in bacteria, chromosomes are generally covalently closed circular DNA molecules while they are linear in eukaryotes. DNA circularity can result

in the formation of chromosome dimers by homologous recombination (McClintock, 1932), which threatens the segregation of genetic information (Figure 1A). Indeed, inactivation of chromosome dimer resolution (CDR) in *Escherichia coli* results in ~15% of cell death per generation under laboratory growth conditions (Perals et al., 2000), which corresponds to the estimated rate of chromosome dimers formed at each cell generation (Steiner & Kuempel, 1998b). The potential cumulative chances of dimer formation in bacteria with multiple circular chromosomes therefore suggested that CDR could be crucial for the maintenance of the two chromosomes of *V. cholerae*.

The mechanism of CDR was originally elucidated in *E. coli*. In this organism, it depends on the addition of a crossover at *dif*, a 28bp site located at the opposite of the origin of replication on the chromosome, by two related tyrosine recombinases, XerC and XerD (Figure 1A; see (Barre & Sherratt, 2002) for a review). In addition, CDR depends on two activities of a cell division protein, FtsK. FtsK functions as a DNA pump anchored in the septum (Aussel et al., 2002, Massey et al., 2006). It loads on DNA trapped within the division septum due to dimer formation (Figure 1A). FtsK loading is oriented by specific DNA motifs, the KOPS, which dictates the orientation of translocation (Figure 1A; (Bigot et al., 2006)). KOPS are skewed on the two replichores of the chromosome with *dif* located at the junction of their polarity (Levy et al., 2005, Bigot et al., 2005). Thus, *dif* sites carried by a dimer are brought together by FtsK translocation (Figure 1A). FtsK also serves to activate recombination at *dif* via a direct interaction with XerD (Yates et al., 2006, Yates et al., 2003). *dif* contains two 11bp binding sites for XerC and XerD, separated by a central region at the outer boundary of which recombination occurs. During recombination, two pairs of DNA strands are exchanged sequentially by the successive catalytic activities of XerC and

XerD, with a Holliday junction (HJ) as an essential reaction intermediate. Consequently, there are two possible pathways for the addition of a crossover depending on whether XerC or XerD initiates the first pair of strand exchanges (Figure 1B). In the absence of FtsK, the synaptic complex made by XerC and XerD at *dif* adopts a configuration in which XerC-strand exchanges are favored (Barre et al., 2000). However, the resulting HJs are unstable and/or transient, being rapidly converted back to substrate by a second round of XerC-strand exchanges. As a consequence, this pathway is a dead-end for CDR (Aussel et al., 2002, Barre et al., 2000). The interaction between XerD and FtsK switches the XerCD-*dif* synaptic complex to a form in which XerD-strand exchanges are favored (Aussel et al., 2002). This allows XerD to perform the first pair of strand exchanges. The resulting HJ is converted to a crossover by a second pair of strand exchanges, which is catalyzed by XerC independently of FtsK (Figure 1B, chromosomal pathway). Thus, in *E. coli*, the requirement for FtsK to bring *dif* sites together and to activate the catalytic activity of XerD coordinates CDR with the last stage of cell division (Kennedy et al., 2008).

The *E. coli* pathway of CDR is not universal. For instance, *Streptococci* and *Lactococci* possess only a single tyrosine recombinase, XerS, for CDR (Le Bourgeois et al., 2007). Plasmid and viruses have also adopted different site-specific recombination systems to avoid multimerization of their genome. In *E. coli*, some of them depend on their own recombinases, such as phage P1, which encodes the Cre tyrosine recombinase (Abremski *et al.*, 1983), while others use the two Xer recombinases of their host (Blakely et al., 1993, Cornet et al., 1994). In the later case, XerC-catalysis initiates recombination (Barre & Sherratt, 2002). The reaction occurs independently of FtsK or cell division (Figure 1B, plasmid pathway). Instead, it depends on ~200bp of accessory sequences, which flank the plasmid sites and

which are bound by accessory proteins. Finally, Xer plasmid sites display a very high heterogeneity, notably in their central region (Figure 1C). In contrast, alignment of 29 different chromosomal sites from γ-Proteobacteria reveals a strong conservation of the central region, suggesting that it is under selective pressure (Figure 1C). Indeed, it has been reported that a few changes in the central region of recombination sites can abolish their activity in CDR (Capiaux et al., 2002) or can allow them to be efficiently recombined independently of FtsK (Recchia et al., 1999). In conclusion, two pathways of Xer recombination have been identified: the chromosomal FtsK-dependent pathway, in which XerD-catalysis initiates strand exchanges and the plasmidic FtsK-independent pathway, in which XerC-catalysis initiates strand exchanges.

Orthologues of *E. coli* XerC, XerD and FtsK are readily identified on the largest chromosome of the *V. cholerae* strain N16961 ($XerC^{Vc}$, $XerD^{Vc}$, $FtsK^{Vc}$, Figure 1D) whereas its second chromosome does not encode any site-specific recombination system that could be implicated in CDR apart from the superintegron integrase (IntIA, Figure 1D). N16961 chromosome I and II both carry *dif*-like sequences, *dif*1 and *dif*2, which were originally identified as integration sites for the Cholera Toxin phage, CTXϕ (Huber & Waldor, 2002). However, two features of the *V. cholerae* Xer recombination system, which could be linked to the co-existence of two non-homologous chromosomes inside the same bacterium, were intriguing. First, it has been reported that the position of cleavage of $XerD^{Vc}$ on *dif*1might differ from the one of its *E. coli* orthologue on *dif* (McLeod & Waldor, 2004), even if *dif*1 differs from the *dif* consensus of γ-Proteobacteria by only 2 bases (Figure 1C). Second, 5 bases of *dif*2 are not conserved, of which four belong to the central region (Figure 1C). This observation, coupled with previous reports indicating that the replication initiation and

partition systems of chromosome II are related to plasmid systems, raised several questions on the control of CDR for chromosome II.

Here, we present the first formal study of CDR in *V. cholerae* and measure the rate of chromosome dimer formation on the two *V. cholerae* chromosomes under laboratory growth conditions. We show that the cell division protein $FtsK^{Vc}$ activates recombination by $XerC^{Vc}$ and $XerD^{Vc}$ at *dif*1 and *dif*2. In addition, we show that the activity of $FtsK^{Vc}$ is directed by specific DNA motifs, which display the same skewed distribution on the two chromosomes, *dif*1 and *dif*2 being located at the junction of their polarity. Taken together, these results suggest that a common FtsK-dependent Xer recombination pathway serves to resolve dimers of the two chromosomes of *V. cholerae*. This is the first example of a *bona fide* chromosomal process for the management of chromosome II and of a cell cycle coordination mechanism shared by the two chromosomes. We further show that *V. cholerae* XerC, XerD and FtsK have co-evolved to allow for fully efficient and fully controlled recombination at the two divergent *dif*1 and *dif*2 CDR sites. Finally, we found that in most bacteria with multipartite genomes, the central regions of resolution sites of non-homologous chromosomes are also divergent and we provide evidence that this probably serves to avoid the generation of chromosome hybrids by Xer recombination, which could otherwise disrupt the genomic organization of these bacteria.

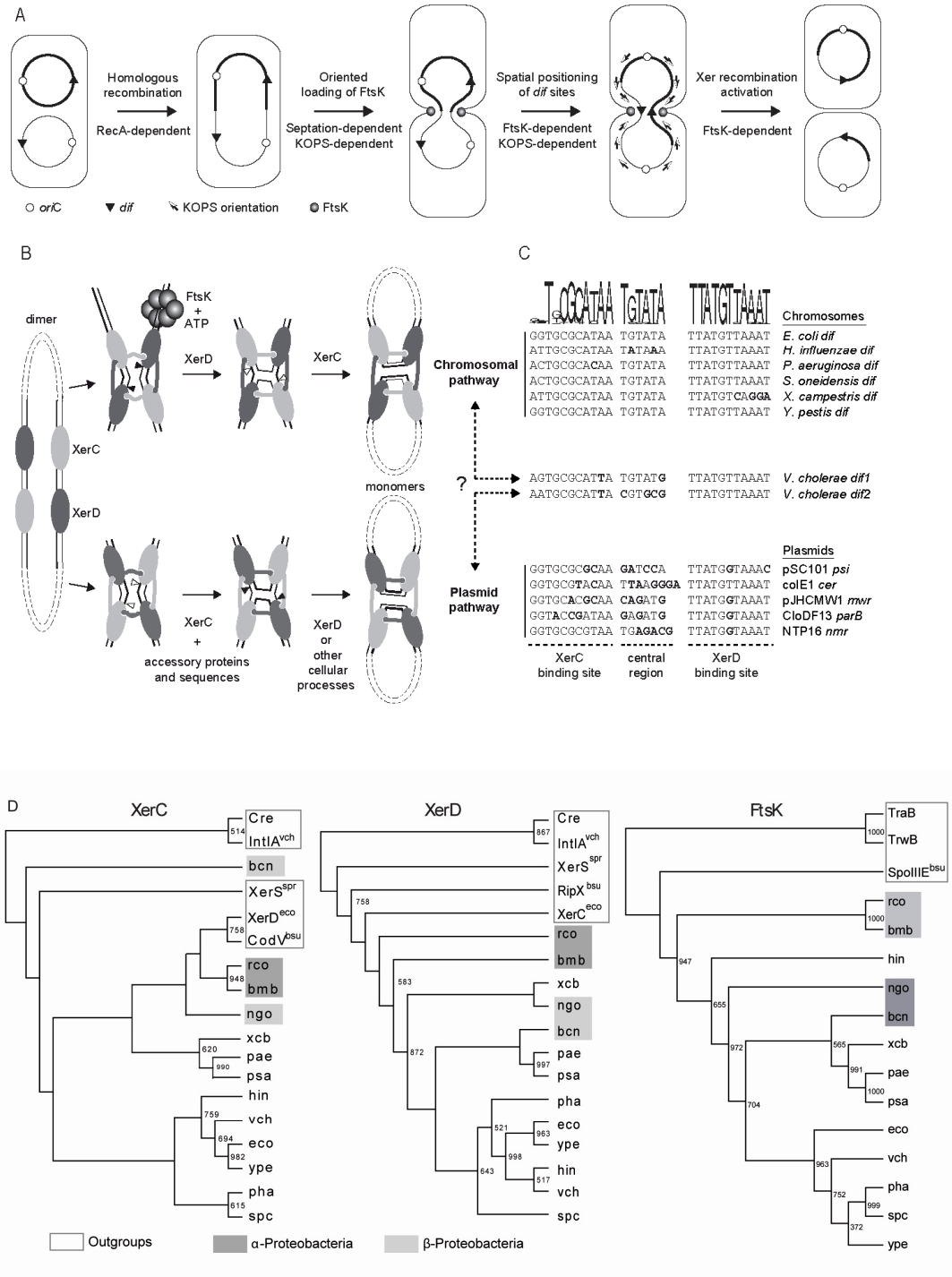

A
Homologous recombination
RecA-dependent
Oriented loading of FtsK
Septation-dependent KOPS-dependent
Spatial positioning of dif sites
FtsK-dependent KOPS-dependent
Xer recombination activation
FtsK-dependent
oriC
dif
KOPS orientation
FtsK
B
dimer
FtsK + ATP
XerD
XerC
XerC
XerD
monomers
XerC + accessory proteins and sequences
XerD or other cellular processes
Chromosomal pathway
Plasmid pathway
?
C
Chromosomes
GGTGCGCATAA TGTATA TTATGTTAAAT E. coli dif
ATTGCGCATAA TATAAA TTATGTTAAAT H. influenzae dif
ACTGCGCACAA TGTATA TTATGTTAAAT P. aeruginosa dif
ACTGCGCATAA TGTATA TTATGTTAAAT S. oneidensis dif
ATTGCGCATAA TGTATA TTATGTCAGGA X. campestris dif
GGTGCGCATAA TGTATA TTATGTTAAAT Y. pestis dif
AGTGCGCATTA TGTATG TTATGTTAAAT V. cholerae dif1
AATGCGCATTA CGTGCG TTATGTTAAAT V. cholerae dif2
Plasmids
GGTGCGCGCAA GATCCA TTATGGTAAAC pSC101 psi
GGTGCGTACAA TTAAGGGA TTATGTTAAAT colE1 cer
GGTGCACGCAA CAGATG TTATGGTAAAT pJHCMW1 mwr
GGTACCGATAA GAGATG TTATGGTAAAT CloDF13 parB
GGTGCGCGTAA TGAGACG TTATGGTAAAT NTP16 nmr
XerC binding site
central region
XerD binding site
D
XerC
Cre
IntIA vch
bcn
XerS spr
XerD eco
CodV bsu
rco
bmb
ngo
xcb
pae
psa
hin
vch
eco
ype
pha
spc
XerD
Cre
IntIA vch
XerS spr
RipX bsu
XerC eco
rco
bmb
xcb
ngo
bcn
pae
psa
pha
eco
ype
hin
vch
spc
FtsK
TraB
TrwB
SpoIIIE bsu
rco
bmb
hin
ngo
bcn
xcb
pae
psa
eco
vch
pha
spc
ype
Outgroups
α-Proteobacteria
β-Proteobacteria

Figure 1. FtsK-dependent and FtsK-independent Xer recombination.

A. Chromosome dimer formation and resolution in *E. coli*. The two homologous chromosomes are depicted by thick and thin lines, to allow for the vizualization of crossovers.
B. *E. coli* Xer recombination can follow two pathways depending on whether strand exchanges are initiated by XerD-catalysis (top) or XerC-catalysis (bottom). The synaptic complex is viewed from the C-terminal side of the recombinases, to show the C-terminal interactions of XerC and XerD. Strands cleaved by XerC and XerD are shown with thick and thin lines, respectively. Positions of strand cleavages by XerC and XerD are indicated by white and black triangles, respectively.
C. Comparison of chromosomal and plasmid-like XerC/D recombination sites. WebLogo representation of the consensus chromosomal *dif* site of 30 different γ-Proteobacteria *dif* sites (http://weblogo.berkeley.edu/). Bases that differ from the consensus are indicated in bold letters. The XerC-binding site, XerD-binding site and central region of dif^{Ec} are indicated by dotted lines below the alignment.
D. Phylogenetic comparison of *E. coli* XerCD and FtsK homologues in Proteobacteria. Species abbreviations follow the KEGG convention (http://www.genome.jp/kegg/). α-and β-Proteobacteria proteins are shaded in light grey and dark grey, respectively. Proteins used as outgroups are boxed in light grey.

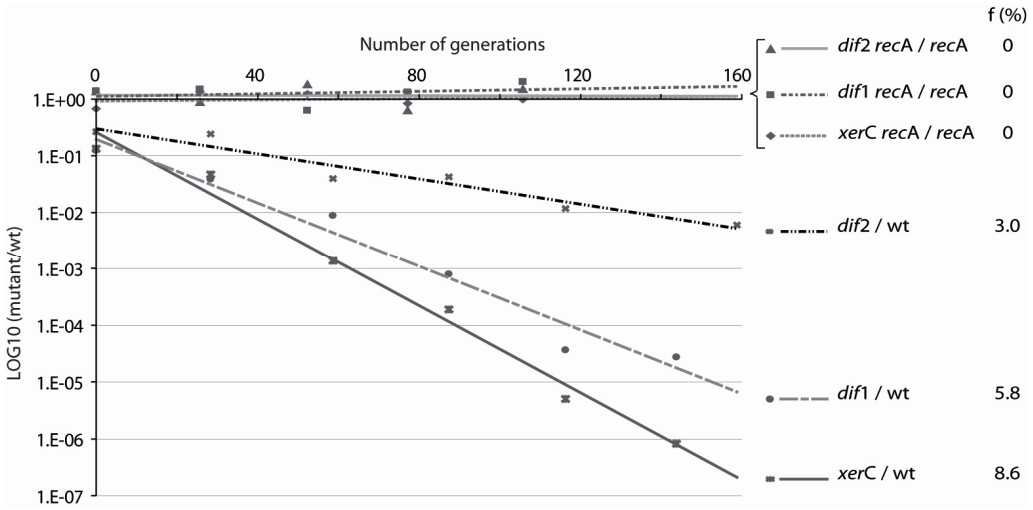


Figure 2. Growth competition of *V. cholerae* deficient in CDR strains against their parent.

f: frequency of cells that the mutant strains fail to produce at each generation compared to their parent.

Results

Chromosome dimer formation in *V. cholerae.*

The weak phenotype of *V. cholerae* cells deleted for *xerC* or *dif*1 fits with a defect in CDR (Huber & Waldor, 2002). However, no quantitative analysis of their use in the cell cycle of *V. cholerae* had been performed. This can be done with growth competition experiments, in which the growth of a mutant strain deficient in CDR is directly compared to the growth of its parent. In *V. cholerae*, growth competitions in rich media revealed a defect of 5.8% and 3% per cell per generation for Δ*dif*1 and Δ*dif*2 cells compared to their wild type counterparts (Figure 2). Since these growth defects were entirely suppressed in a *rec*A background (Figure 2), they directly reflect the rates of dimer formation on chromosome I and II, f_{dimer}^{Chr1} and f_{dimer}^{Chr2} (See Material and methods). The 8.6% growth defect of *xer*C^{Vc} cells, which was also suppressed in a *rec*A background, reflects the total rate of chromosome dimer formation in *V. cholerae*, f_{dimer}^{Chr1+2} (Figure 2). Interestingly, f_{dimer}^{Chr1+2} equals $1-(1-f_{dimer}^{Chr1})(1-f_{dimer}^{Chr2})$, further indicating that dimer formation on the two *V. cholerae* chromosomes is independent.

In vitro cleavage by the *V. cholerae* recombinases on *dif*1 and *dif*2.

Tyrosine recombinases usually cleave their target DNA at the junction between their binding site and the central region. This was observed for XerC^{Vc} at *dif*1 and at the integration site of CTXϕ (McLeod & Waldor, 2004, Val et al., 2005). However, it was reported that XerD^{Vc} cleaves inside the central region of *dif*1, one base pair away from the junction (McLeod & Waldor, 2004). This unexpected result prompted us to re-investigate the mechanism of action of these recombinases on *dif*1 and *dif*2.

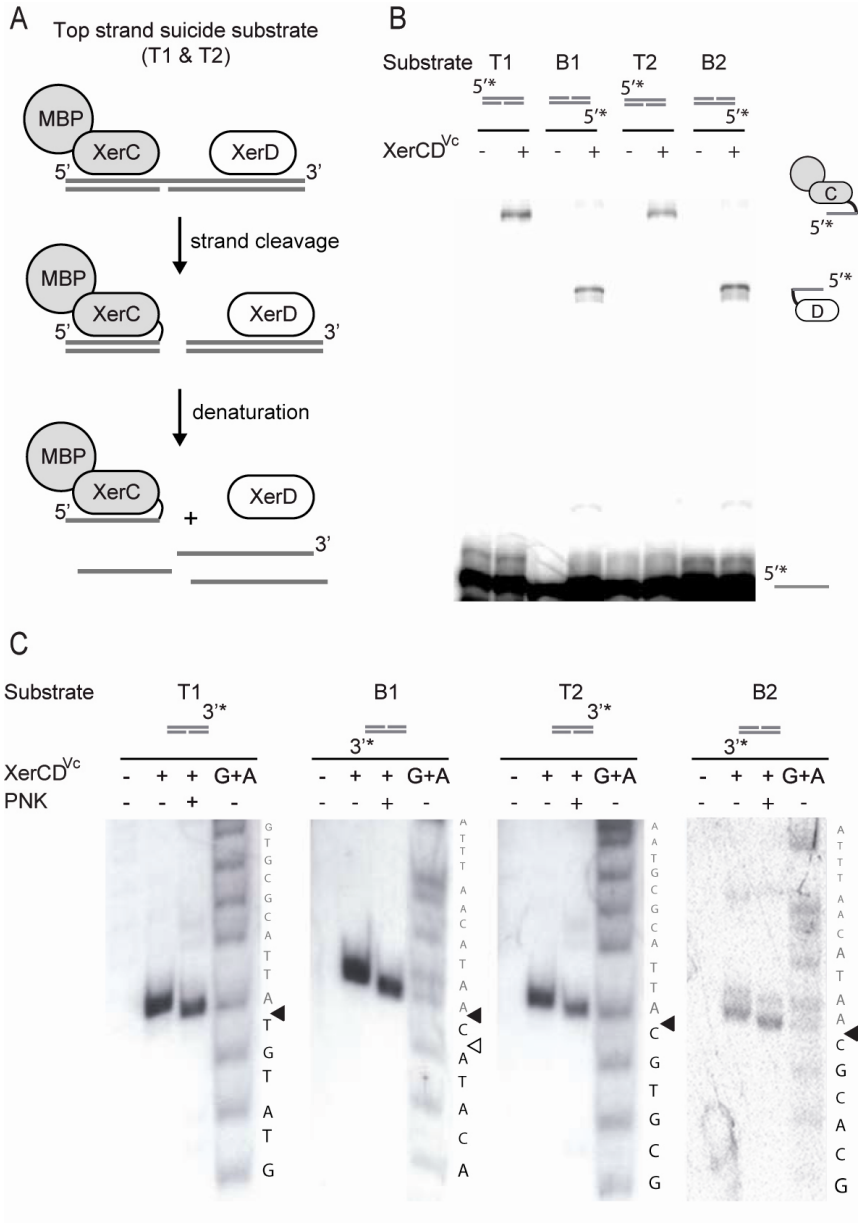


Figure 3. *In vitro* cleavage of *dif*1 and *dif*2 by the *V. cholerae* recombinases.
A. Scheme of the top strand suicide substrates (T1, T2) used in this study and of the end-products generated by XerC cleavage. Bottom strand suicide substrates (B1, B2) carry a nick on the opposite strand. **B.** Covalent complex formation by MBPXerC^{Vc} and XerD^{Vc} on suicide substrates of *dif*1 (T1, B1) or *dif*2 (T2, B2). T: top strand labeled suicide substate; B: bottom stand labeled suicide substrate; *: radioactive label. Schemes of substrates and products are shown on the top and on the right of the gel, respectively. **C.** Cleavage points of XerC^{Vc} and XerD^{Vc} on *dif*1 and *dif*2. PNK: phosphorylation with T4 polynucleotide kinase; G+A: chemical cleavage ladder. Schemes of substrates are shown on the top of the gels. Sequences resulting from the chemical cleavage are indicated beside the gels. Purine bases are highlighted in bold. The deduced cleavage points are indicated by black triangles. A white triangle indicates the XerD-cleavage position on *dif*1 reported in (McLeod & Waldor, 2004).

Tyrosine recombinases form transient 3'-phosphotyrosil DNA-protein covalent complexes during strand exchanges, which can be detected if the strand cleaved by the recombinase is labeled on its 5' side (Figure 3A). The molecular weight of $XerC^{Vc}$ and $XerD^{Vc}$ being very similar, we used a maltose binding protein fusion of $XerC^{Vc}$ ($MBPXerC^{Vc}$) in conjunction with $XerD^{Vc}$ to avoid any confusion between the two possible covalent complexes. In addition, we used synthetic suicide substrates, in which a nick opposite the position attacked by the recombinase prevents any reverse reaction, to increase the proportion of covalent complexes detected (Figure 3A). For both *dif*1 and *dif*2, $MBPXerC^{Vc}$- and $XerD^{Vc}$-DNA covalent complexes were observed when the DNA was labeled on the top strand (Figure 3B, T1 and T2) and the bottom strand (Figure 3B, B1 and B2), respectively. Identical results were obtained with suicide substrates carrying nicks at the center of the central region, albeit with fainter signals (data not shown). Thus, $XerC^{Vc}$ cleaves the top strand of *dif*1 and *dif*2 and $XerD^{Vc}$ the bottom strand.

We then analyzed the sequence of the 3' end DNA fragments liberated by the attack of each of the two *V. cholerae* Xer recombinases (Figure 3A). To this aim, the attacked strand was labeled on its 3' end. Liberated fragments migrated faster after kinase treatment than before (Figure 3C, PNK), indicating that the action of $XerC^{Vc}$ and $XerD^{Vc}$ generated a 5'OH DNA extremity, as expected from the tyrosine recombinases cleavage mechanism. Phosphorylated fragments were then compared to a ladder obtained by chemical cleavage at purine bases (Figure 3C, G+A). We could thus unambiguously show that $XerC^{Vc}$ and $XerD^{Vc}$ cleave DNA at the junction between their respective binding site and the central region of *dif*1 and *dif*2.

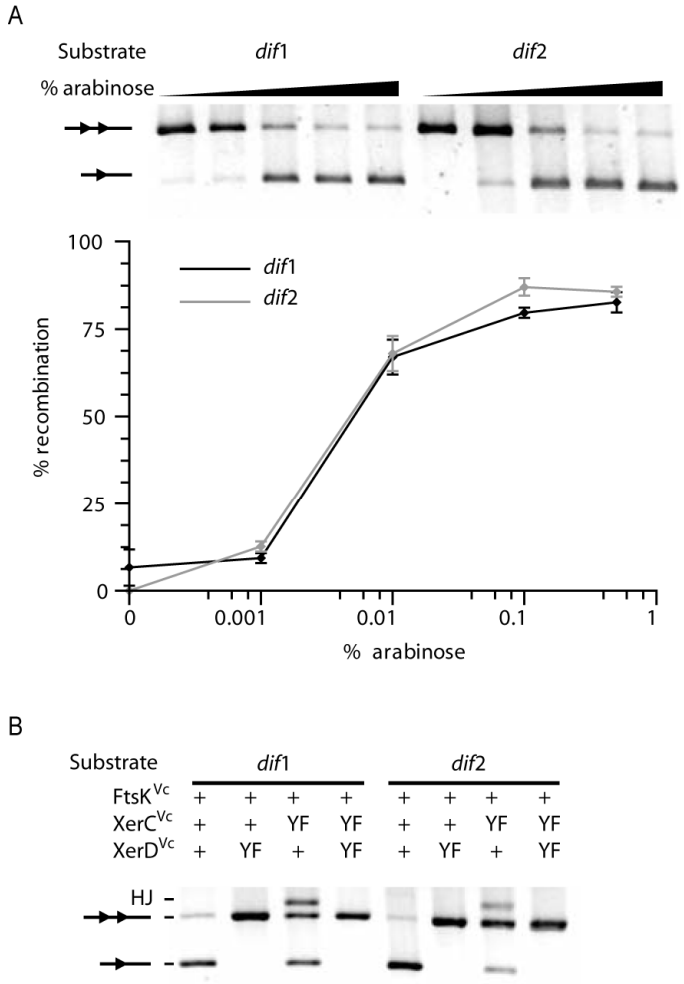


Figure 4. FtsK^{Vc}-dependent recombination at *dif*1 and *dif*2.
A. Reconstitution of *V. cholerae* Xer recombination at plasmid-borne *dif*1 and *dif*2 sites in *E. coli* cells. Top panel: gel showing a typical result. A scheme of the substrate and product bands is shown beside the gel. *dif* sites are represented by triangles. Bottom Panel: quantification plot displaying the mean and standard deviations of at least three independent experiments.
B. Recombination by wild-type (+) and catalytically inactive (YF) recombinases. HJ: HJ intermediate.

FtsK-dependent recombination at *dif*1 and *dif*2.

We next wanted to investigate the recombination pathways followed at *dif*1 and *dif*2. Analysis of the DNA sequence immediately upstream and downstream of *dif*1 and *dif*2 in different Vibrio species did not reveal any conserved motifs that could serve to bind accessory proteins (data not shown). $FtsK^{Vc}$ was thus left as the most likely candidate for activation of Xer recombination at both sites. To test this possibility, we reconstituted the *V. cholerae* Xer system in *E. coli* cells deleted for their natural *xerC* and *xerD* genes, and expressing $XerC^{Vc}$ in conjunction with $XerD^{Vc}$ from the chromosomal *E. coli xerC* promoter. We worked in *E. coli* $FtsK_C^-$ cells, which produce the N-terminal domain of $FtsK^{Ec}$, essential for viability (Draper *et al.*, 1998), but lack production of the C-terminal domain of $FtsK^{Ec}$, which is necessary for recombination at dif^{Ec} (Barre et al., 2000). The production of $FtsK^{Vc}$ was then controlled by placing the full length $ftsK^{Vc}$ ORF under an arabinose promoter on a high copy number plasmid. Recombination was monitored between directly repeated recombination sites carried by a low copy plasmid. For both *dif*1 and *dif*2, the amount of recombination correlated with the amount of arabinose used for induction, indicating that Xer recombination at *dif*1 and *dif*2 depends on $FtsK^{Vc}$ (Figure 4A).

To determine the order of the strand exchanges in the recombination reactions, we then monitored plasmid recombination in a set of four strains encoding either wild-type $XerC^{Vc}$ and $XerD^{Vc}$ or the $XerC_{YF}^{Vc}$ and $XerD_{YF}^{Vc}$ mutants, in which the catalytic tyrosine is replaced by a phenylalanine (Figure 4B). For both *dif*1 and *dif*2, no resolution product or HJ intermediate were detected in cells producing $XerD_{YF}^{Vc}$. In contrast, we could detect the accumulation of a HJ intermediate in $XerC_{YF}^{Vc}$ $XerD^{Vc}$ cells, indicating that $XerD^{Vc}$ mediates the first pair of strand exchanges during both *dif*1 and *dif*2-recombination. Recombination products were still observed in $XerC_{YF}^{Vc}$

XerD^{Vc} cells because other cellular processes than Xer recombination can resolve HJs (Barre & Sherratt, 2002). However, the amount of product was considerably decreased, indicating that intermediate HJs are preferentially resolved to crossovers by the action of XerC^{Vc}.

All together, these results indicate that recombination at *dif*1 and *dif*2 follows a FtsK^{Vc}-dependent chromosomal pathway. We further noted that in the absence of FtsK^{Vc}, XerC^{Vc} cleavage was favored on synthetic *dif*1 and *dif*2 substrates (data not shown). This observation suggests that FtsK^{Vc} activates recombination by switching the synaptic complexes made by XerC^{Vc} and XerD^{Vc} at *dif*1 and *dif*2 from a form in which XerC-strand exchanges are favored to a form in which XerD-strand exchanges are favored.

Species-specificity in Xer recombination activation.

Several residues implicated in the interaction between *E. coli* XerD and FtsK have been mapped (Yates et al., 2006, Yates et al., 2003). These residues are not entirely conserved between the *V. cholerae* and *E. coli* proteins (Figure 5A), which allowed us to further dissect FtsK-dependent recombination activation in *V. cholerae*.

Indeed, the *E. coli* and *V. cholerae* recombinases yielded better recombination efficiencies at *dif*1 and *dif*2 when they were activated by their natural partner (Figure 5B). More importantly, XerCD^{Ec} recombination at *dif*2 remained low even in the presence FtsK^{Ec} (top panel of Figure 5B), indicating that the central region of *dif*2 impedes the catalytic switch of activities promoted by FtsK^{Ec} in the XerCD^{Ec}-*dif*2 synaptic complex. XerC^{Vc} and XerD^{Vc} are more tolerant of the *dif*2 central region, since XerCD^{Vc} recombination at *dif*2 was as efficient as XerCD^{Vc} recombination at

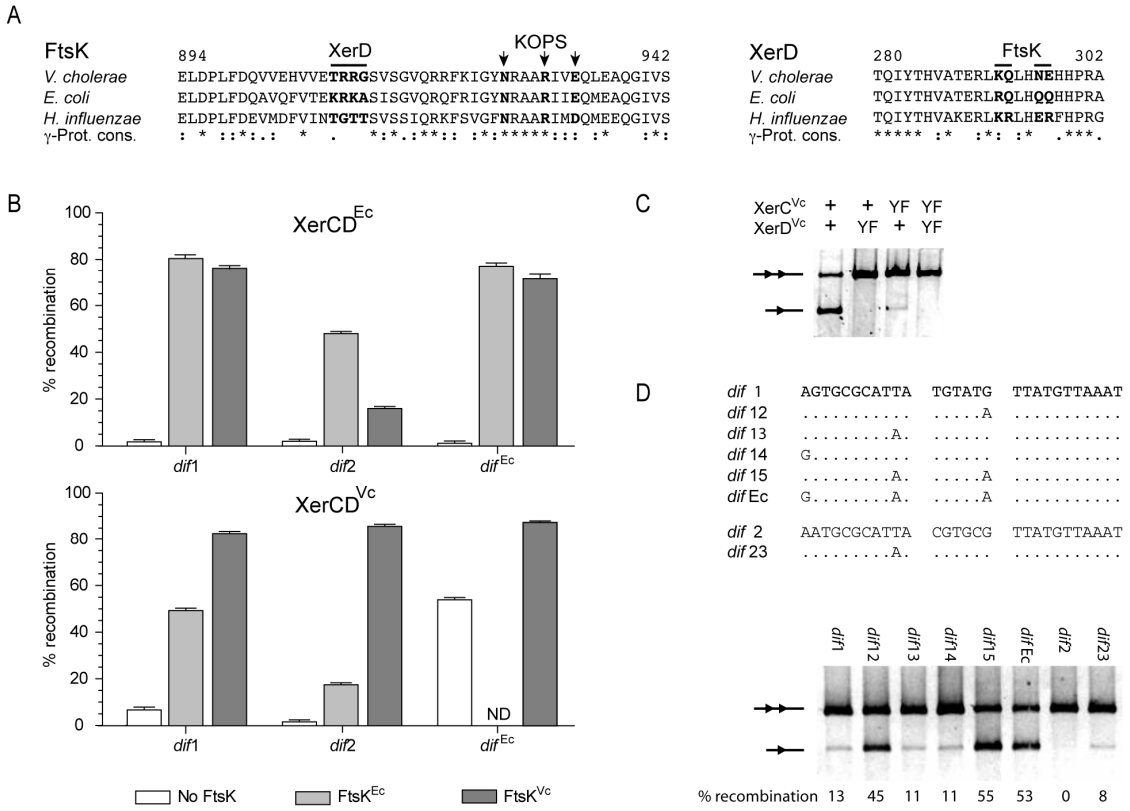
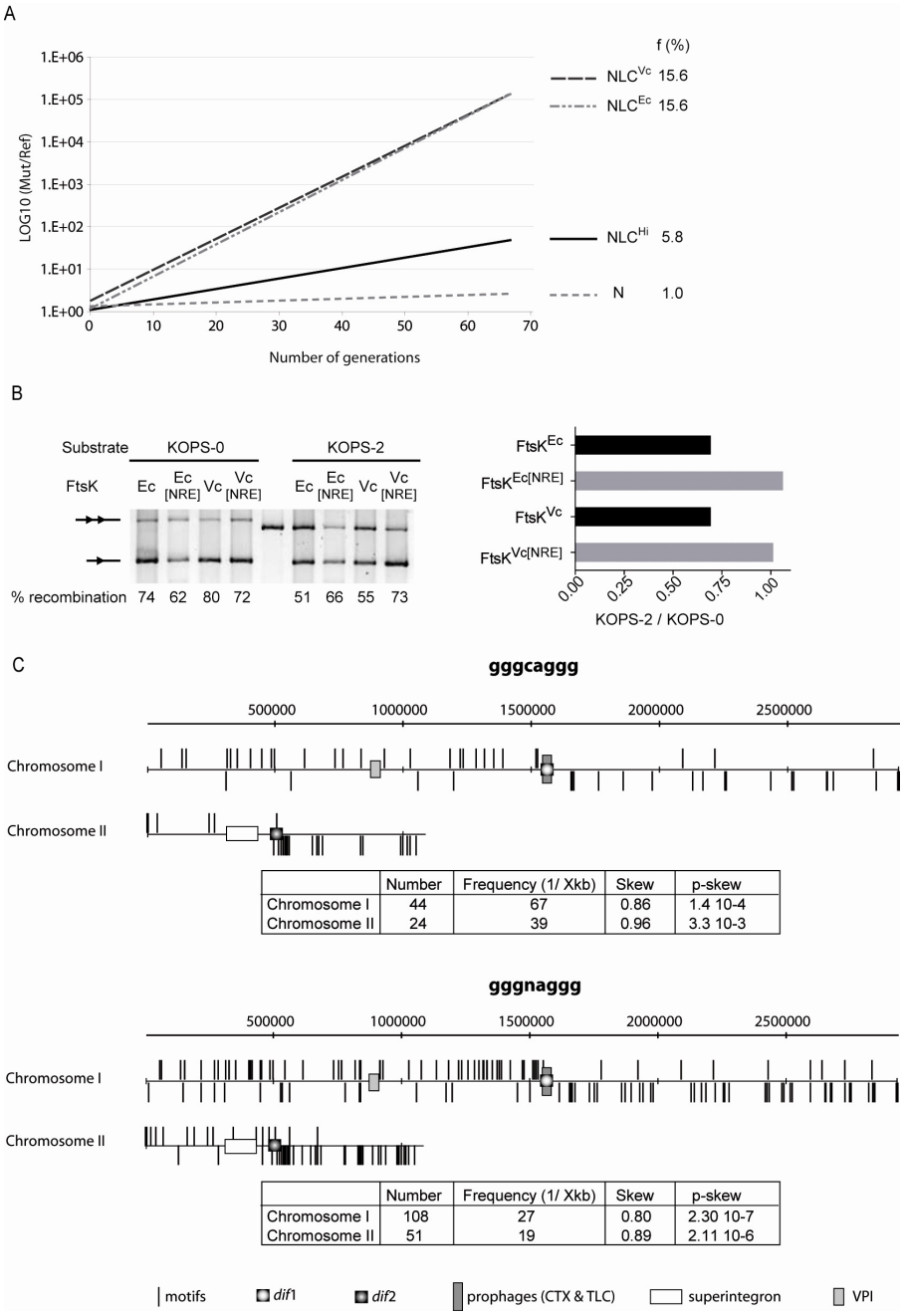


Figure 5. Co-evolution of *V. cholerae* XerC, XerD and FtsK with *dif*1 and *dif*2.
A. Amino acid residue conservation in the γ-domain of FtsK and in the C-terminal tail of XerD. Numbers indicate the position of the first and of the last residues of the alignments in the amino acid sequence of the *V. cholerae* proteins. Positions at which residues are fully conserved in γ-Proteobacteria, at which they belong to strong or weaker groups of conservation are indicated by stars, semin-columns or dots, respectively, following the Clustal 1.83 scheme. The black bar and the vertical arrows on top of the alignments indicate residues supposed to be implicated in FtsK-XerD interaction and in KOPS recognition, respectively.
B. Species-specificity in Xer recombination on plasmid-borne *dif*1, *dif*2 and *dif*^{Ec} sites. The mean and standard deviation of at least three independent experiments are plotted.
C. FtsK-independent recombination at *dif*^{Ec} by wild-type (+) and catalytically inactive (YF) *V. cholerae* recombinases.
D. FtsK-independent recombination by the *V. cholerae* recombinases on hybrid *dif* sites.

*dif*1 in the presence of FtsK^{Vc} (Figure 4A and bottom panel of Figure 5B). However, XerCD^{Vc} recombination was less efficient at *dif*2 than at *dif*1 when activated by FtsK^{Ec}, implying that XerCD^{Vc} and FtsK^{Vc} have co-evolved to maintain of a fully efficient recombination reaction at *dif*2.

We further noticed a partial loss of the control exerted by FtsK on *dif*1-recombination (Figure 5B, No FtsK). This was further exemplified on *dif*^{Ec} substrates, in which 53% of recombination was observed on plasmids in the absence of FtsK in cells expressing the *V. cholerae* recombinases (Figure 5B). FtsK-independent recombination at *dif*^{Ec} has been previously observed using XerD^{Ec} in conjunction with *H. influenzae* XerC (Neilson et al., 1999). In this context, *H. influenzae* XerC initiates recombination. In the XerCD^{Vc}-*dif*^{Ec} context, however, resolution products were detected in the absence of XerC catalysis (Figure 5C, XerC$_{YF}$^{Vc} strains) but not in the absence of XerD catalysis (XerD$_{YF}$^{Vc} strains), signifying that XerD^{Vc} catalysis initiates recombination. Indeed, an equal amount of XerC^{Vc}- and XerD^{Vc}-covalent complexes were observed on synthetic *dif*^{Ec} substrates in the absence of FtsK, whereas the *E. coli* recombinases yielded 85% of XerC^{Ec}-complexes (data not shown). These results suggest that the synaptic complex made by the *V. cholerae* recombinases at *dif*1 and *dif*^{Ec} can adopt a form in which XerD-strand exchanges are favored in the absence of FtsK.

*dif*1 differs from the γ-Proteobacteria consensus by only 2 bp, the substitution of A^{17} by G and the substitution of A^{10} by T (Figure 5D). We therefore analyzed FtsK-independent XerCD^{Vc} recombination at hybrid sites between *dif*, *dif*1 and *dif*2 to identify residues important for the above observation (Figure 5D). A site carrying the single [G-A]^{17} substitution promoted a much higher level of FtsK-independent recombination (*dif*12), while recombination at sites carrying the [T-A]^{10} and [G-A]^{1}



	Number	Frequency (1/ Xkb)	Skew	p-skew
Chromosome I	44	67	0.86	1.4 10-4
Chromosome II	24	39	0.96	3.3 10-3

	Number	Frequency (1/ Xkb)	Skew	p-skew
Chromosome I	108	27	0.80	2.30 10-7
Chromosome II	51	19	0.89	2.11 10-6

Figure 6. *V. cholerae* FtsK Orienting Polar Sequences.
A. Growth competition of *E. coli* cells encoding FtsK hybrids. N: cells carrying a complete deletion of the C-terninal domain and linker region of $FtsK^{Ec}$; NLC^{Ec}: cells carrying full length $FtsK^{Ec}$; NLC^{Vc} and NLC^{Hi}: cells carrying a fusion between the N-terminal and linker domains of $FtsK^{Ec}$ and the C-terminal domain of *V. cholerae* or *H. influenzae* FtsK, respectively.
B. 5'-GGGCAGGG-3' inhibits recombination activation by $FtsK^{Vc}$. Plasmid recombination at *E. coli dif* by $XerCD^{Ec}$ was induced with 0.5% arabinose. Ec[NRE]: $FtsK_{50C}{}^{Ec}$[NRE]; Vc[NRE]: $FtsK^{Vc}$[NRE]. KOPS-0: substrate without GGGCAGGG sequences; KOPS-2: substrate with triple overlapping GGGCAGGG sequences in the non-permissive orientation on both sides of the two *dif* sites.
C. Scheme of the two *V. cholerae* chromosomes showing the distributions of the GGGCAGGG and GGGNAGGG motifs. Upper bars: motifs found in the leading strand; Lower bars: motifs found in the lagging strand. Number, frequency, skew and skew significance (p-skew) are indicated for each motif. Recently acquired genomic regions are indicated (superintegron, CTX and TLC prophages and the Vibrio Pathogenicity Island VPI).

substitutions was not altered (*dif*13 and *dif*14). However, the cumulative substitutions of $[G\text{-}A]^{17}$ and $[T\text{-}A]^{10}$ increased FtsK-independent recombination to a level equivalent to dif^{Ec}-recombination (*dif*15). In addition, when T^{10} was altered to A in *dif*2, we observed a faint recombination product (*dif*23), which was significant since FtsK-independent recombination was never observed at *dif*2. Thus, G^{17} in the central region of *dif*1 and T^{10} in the XerC-binding site of *dif*1 and *dif*2 appear to have an important role in keeping Xer recombination under the tight control of FtsK in *V. cholerae*, further illustrating the co-evolution of *dif*1, *dif*2, $XerC^{Vc}$, $XerD^{Vc}$ and $FtsK^{Vc}$.

***V. cholerae* FtsK Orienting Polar Sequences.**

We next investigated if $FtsK^{Vc}$ could serve to bring together the CDR sites carried by dimers of chromosome I or chromosome II. Several key residues implicated in KOPS recognition have been identified in the γ domain of $FtsK^{Ec}$ (Figure 5A; N1296; R1300; E1303; (Sivanathan et al., 2006)). The conservation of these residues in $FtsK^{Vc}$ suggested that it could recognize the same motifs (Figure 5A; N926; R930; E933).

This was first tested by replacing the C-terminal domain of $FtsK^{Ec}$ with the one of $FtsK^{Vc}$ in *E. coli* cells. The fitness of these cells, as measured in a growth competition experiment against a strain carrying a C-terminal deletion of $FtsK^{Ec}$, equalled the fitness of wild-type *E. coli* cells (Figure 6A, NLC^{Vc} and NLC^{Ec}). This complete rescue of CDR suggests that, in addition to fully activating recombination at dif^{Ec} by $XerCD^{Ec}$, NLC^{Vc} can read the polarity of the *E. coli* chromosome *in vivo* (Figure 6A).

To test for the ability of $FtsK^{Vc}$ to specifically recognize one of the *E. coli* KOPS motifs, we then compared the efficiency with which it activates *E. coli* Xer recombination between plasmid-borne dif^{Ec} sites flanked or not by the 5'-GGGCAGGG-3' motif in an orientation that should prevent $FtsK^{Vc}$ from translocating towards dif^{Ec} (Figure 6B, KOPS-2 and KOPS-0, respectively). Indeed, the efficiency of recombination dropped significantly on KOPS-2 whether $FtsK^{Ec}$ or $FtsK^{Vc}$ were used as activators (Figure 6B, $FtsK^{Ec}$ and $FtsK^{Vc}$). We then engineered an allele of $ftsK^{Vc}$ carrying identical mutations to the one shown to abrogate KOPS recognition in $FtsK^{Ec}$ (Sivanathan et al., 2006). No difference in recombination efficiency was noticeable between KOPS-0 and KOPS-2 when using this allele or its *E. coli* homologue (Figure 6B; $FtsK_{50C}^{Ec}$[N1296A; R1300A; E1303A] and $FtsK^{Vc}$[N926A; R930A; E933A]). We conclude that $FtsK^{Vc}$ directly recognizes the GGGCAGGG motif and that recognition engages amino acids N926, R930 and E933.

We decided therefore to analyse the skew and frequency of the GGGCAGGG motif on chromosome I and II. GGGCAGGG is highly polarized on both chromosomes with statistically significant skews (Figure 6C). On chromosome I, the skew switches precisely at *dif*1 whereas on chromosome II one motif is present on the reverse orientation a few kb before *dif*2 (Figure 6C). However, it has been shown in *E. coli* that a single non-permissive KOPS motif in the vicinity of *dif* is not sufficient to impair recombination (Bigot et al., 2005). The frequency of GGGCAGGG is low on both *V. cholerae* chromosomes (Figure 6C), suggesting that this motif is not sufficient by itself to provide polar orientation of $FtsK^{Vc}$. We therefore analyzed the distribution of all octamers motif families with one degenerated position on both chromosomes. We ranked potential candidates according to their skew significance keeping only families that had a skew of at least 80% and a frequency of at least once every 30kb.

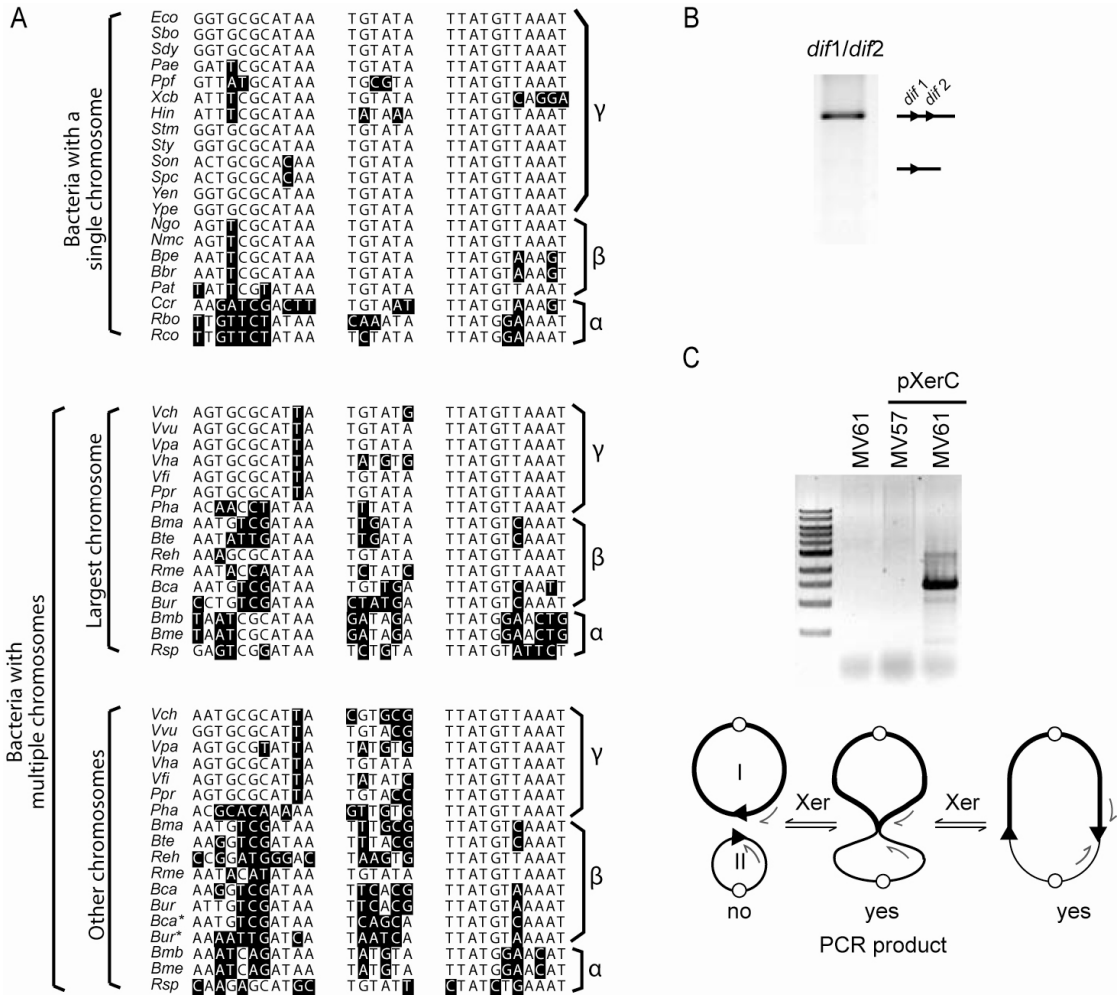


Figure 7. Harmonization of *dif*1 and *dif*2 leads to chromosome fusions.

A. Alignment of the chromosome dimer resolution sites of a few Proteobacteria harboring a single or multiple chromosomes. Bases identical to the γ-Proteobacteria *dif* consensus are shaded in black. Species abbreviations follow the KEGG convention.

B. Xer recombination between *dif*1 and *dif*2 on plasmid.

C. The CDR sites of the two *V. cholerae* chromosomes can be synapsed. Interchromosomal Xer recombination aptitude was assessed by PCR in strains carrying two distinct CDR sites, *dif*1 and *dif*2, on each of the two *V. cholerae* chromosomes (MV57) or two identical CDR sites (*dif*1, MV61). XerC was expressed from a plasmid and under its own promoter. Scheme of the two *V. cholerae* chromosomes, of the hybrid chromosome created by Xer recombination and of the HJ intermediate showing the positions of the oligonucleotides used for amplification. *dif* sites are indicated by a black triangle, origins of replication by white circles.

Only one family (GGGNAGGG) was among the 10 best candidates of both chromosomes. This family is highly skewed, frequent (Figure 6C) and contains the experimentally active GGGCAGGG motif. Taken together, these results suggest that the GGGNAGGG motifs function as KOPS in *V. cholerae*.

Divergence of the central region of CDR sites in bacteria with multipartite genomes.

We wished to compare our findings in *V. cholerae* to more distant organisms harboring multiple chromosomes. Putative *dif* sites were readily identified in 29 γ-Proteobacteria by their homology to dif^{Ec} (Figure 7A and Supplementary information 1). For β- and α-Proteobacteria, we generated a profile Hidden Markov Model (HMM) based on the alignment of the 29 γ-Proteobacteria sites using the program HHMER. In most cases, the highest scoring hit from HMMER fell within 10 Kb of the GC-skew inflection point. We also compared each sequence by hand to insure the proper 6 bp spacing between the XerC and XerD binding sites. Thus, we were able to identify putative *dif* sites from an additional 14 β-Proteobacteria species and 11 α-Proteobacteria species (Figure 7A and Supplementary information 2 and 3).

We observed little sequence conservation in the central region of *dif* sites from bacteria with multipartite genomes (Figure 7A and Supplementary information 1-3). This was even true for *dif* sites carried by homologous chromosomes in closely related species, such as the Vibrios (Figure 7A). We further noticed that within each species, the central regions of *dif* sites from non-homologous chromosomes were kept divergent (Figure 7A and Supplementary information 1-3).

A

```
Consensus RNTGCGCATAATGTATATTATGTTAAAT
Eco       GGTGCGCATAATGTATATTATGTTAAAT
Hin       ATTTTCGCATAATATAAATTATGTTAAAT
Pae       GATTTCGCATAATGTATATTATGTTAAAT
Pen       TGTGCGCATAATGTATATTATGTTAAAT
Pfl       CATTTCGCATAATGTATATTATGTTAAAT
Pmy       TGTTTCGCATAATGTATATTATGTTAAAT
Ppf       GTTATGCATAATGCGTATTATGTTAAAT
Psa       ATTTTCGCATAATCTATATTATGTTAAAT
Pst       GTTACGCATAATGTATATTATGTTAAAT
Sty       GGTGCGCATAATGTATATTATGTTAAAT
Stm       GGTGCGCATAATGTATATTATGTTAAAT
Son       ACTGCGCACAATGTATATTATGTTAAAT
Spc       ACTGCGCACAATGTATATTATGTTAAAT
Sbo       GGTGCGCATAATGTATATTATGTTAAAT
Sdy       GGTGCGCATAATGTATATTATGTTAAAT
Sfv       ACTGCGCATAATGTATATTATGTTAAAT
Ssn       TGTGCGCATAATGTATATTATGTTAAAT
Xcb       ATTTTCGCATAATGTATATTATGTCAGGA
Yen       GGTGCGCATAATGTATATTATGTTAAAT
Ype       GGTGCGCATAATGTATATTATGTTAAAT
Yps       GGTGCGCATAATGTATATTATGTTAAAT
Ppr       AGTGCGCATTATGTATATTATGTTAAAT
Pat       TATTCGTATAATGTATATTATGTTAAAT
Pha       ACAACCTATAATTTATATTATGTTAAAT
Vch       AGTGCGCATTATGTATGTTATGTTAAAT
Vfi       AGTGCGCATTATGTATATTATGTTAAAT
Vha       AGTGCGCATTATATGTGTTATGTTAAAT
Vpa       AGTGCGCATTATGTATATTATGTTAAAT
Vvu       AGTGCGCATTATGTATATTATGTTAAAT
Vvy       AGTGCGCATTATGTATATTATGTTAAAT
Ppr2      AGTGCGCATTATGTACCTTATGTTAAAT
Pat2      ACAGCCCATAAATTACGTTATGTTAAAT
Pha2      ACGCACAAAAAGTTGTGTTATGTTAAAT
Vch2      AATGCGCATTACGTGCGTTATGTTAAAT
Vfi2      AGTGCGCATTATATATCTTATGTTAAAT
Vha2      AGTGCGCATTATGTATATTATGTTAAAT
Vpa2      AGTGCGTATTATATGTGTTATGTTAAAT
Vvu2      GGTGCGCATTATGTACGTTATGTTAAAT
Vvy2      AGTGCGCATTATGTACGTTATGTTAAAT
```

Single chromosome

Multiple chromosomes

B

```
Ppr   AGTGCGCATTATGTATATTATGTTAAAT
Ppr2  AGTGCGCATTATGTACCTTATGTTAAAT

Pat   TATTCGTATAATGTATATTATGTTAAAT
Pat2  ACAGCCCATAAATTACGTTATGTTAAAT

Pha   ACAACCTATAATTTATATTATGTTAAAT
Pha2  ACGCACAAAAAGTTGTGTTATGTTAAAT

Vch   AGTGCGCATTATGTATGTTATGTTAAAT
Vch2  AATGCGCATTACGTGCGTTATGTTAAAT

Vfi   AGTGCGCATTATGTATATTATGTTAAAT
Vfi2  AGTGCGCATTATATATCTTATGTTAAAT

Vha   AGTGCGCATTATATGTGTTATGTTAAAT
Vha2  AGTGCGCATTATGTATATTATGTTAAAT

Vpa   AGTGCGCATTATGTATATTATGTTAAAT
Vpa2  AGTGCGTATTATATGTGTTATGTTAAAT

Vvu   AGTGCGCATTATGTATATTATGTTAAAT
Vvu2  GGTGCGCATTATGTACGTTATGTTAAAT

Vvy   AGTGCGCATTATGTATATTATGTTAAAT
Vvy2  AGTGCGCATTATGTACGTTATGTTAAAT
```

Supplemental data S1.
A. Alignment of the *dif* sites of γ–Proteobacteria. Bases differing from the γ–Proteobacteria consensus are shaded in black.
B. Pairwise alignment of *dif* sites harbored within the same bacterium. Divergent Bases are shaded.

A single exception was found in *Burkholderia xenovarans*, in which two of the three chromosomes of the bacterium harbor a resolution site with an identical central region. In contrast, the central region of *dif* sites found in bacteria with a single chromosome showed a high degree of conservation, most β- and γ-Proteobacteria harboring a 5'-TGTATA-3' central region (Figure 7A and Supplementary information 1-2). This suggests that in species with multipartite genomes, there is a selective pressure to keep the central region of *dif* sites harbored by non-homologous chromosomes divergent. This likely competes with the selective pressure for the *dif* central region to adopt the preferential 5'-TGTATA-3' sequence in β- and γ-Proteobacteria.

Harmonization of the two *V. cholerae dif* sites leads to chromosomal fusions. We reasoned that the selective pressure that keeps the central region of *dif* sites harbored by non-homologous chromosomes divergent comes from the necessity to prevent Xer recombination between these sites, which could otherwise generate chromosome hybrids. Indeed, the divergence of the central region of *dif*1 and *dif*2 sites abolished HJ or crossover formation between these sites, even under high FtsK^{Vc} expression (Figure 7B). We decided therefore to test if the two CDR sites harbored by the *V. cholerae* chromosomes can be brought together under normal growth conditions, and could thus be recombined if they possessed identical central regions. To this aim, we constructed a *xer*C *V. cholerae* strain in which *dif*2 was replaced by *dif*1 on chromosome II. Subsequently, *xer*C^{Vc} was reintroduced in the strain on a conjugative plasmid and under its own promoter. The possibility for Xer recombination to occur between the *dif*1 sites harbored by the two non-homologous chromosomes of this strain was then demonstrated using a PCR-based assay (Figure 7C).

A

```
Consensus RNTGCGCATAATGTATATTATGTTAAAT
Single chromosome
Bbr       AATTCGCATAATGTATATTATGTAAAGT
Bpe       AATTCGCATAATGTATATTATGTAAAGT
Ngo       AGTTCGCATAATGTATATTATGTTAAAT
Nmc       AGTTCGCATAATGTATATTATGTTAAAT
Multiple chromosomes
Bma       AATGTCGATAATTGATATTATGTCAAAT
Bpm       AATGTCGATAATTGATATTATGTCAAAT
Bte       AATATTGATAATTGATATTATGTCAAAT
Bcn       AATGTCGATAATGTTGATTATGTCAATT
Bur       CCTGTCGATAACTATGATTATGTCAAAT
Bvi       CCGACTGATAATAATGATTATGTCAAAT
Bxe       TAGGTTGATAATTTATATTATGTCAAAT
Reh       AAAGCGCATAATGTATATTATGTTAAAT
Rme       AATACCAATAATCTATCTTATGTTAAAT
Rso       CCATCGCATAATTTATCTTATGTTAAAT
Bma2      AATGTCGATAATTTGCGTTATGTCAAAT
Bpm2      AATGTCGATAATTTACCTTATGTCAAAT
Bte2      AAGGTCGATAATTTACGTTATGTCAAAT
Bcn2      AAGGTCGATAATTCACGTTATGTAAAAT
Bur2      ATTGTCGATAATTCACGTTATGTAAAAT
Bvi2      CAGATTGATAATTCACGTTATGTAAAGT
Bxe2      TATGTTGATAATTTATCTTATGTCAAGT
Reh2      CCGGATGGGACTAAGTGTTATGTTAAAT
Rme2      AATACATATAATGTATATTATGTTAAAT
Rso2      CCATCGCATAATTATTGTTATGTAAAAT
Bcn3      AATGTCGATAATCAGCATTATGTCAAAT
Bur3      AAAATTGATCATAATCATTATGTAAAAT
Bvi3      CCGACCGATAATCCGCATTATGTAAAAT
Bxe3      CATGTTGATAATTTATATTATGTCAAAT
```

B

```
Bma       AATGTCGATAATTGATATTATGTCAAAT
Bma2      AATGTCGATAATTTGCGTTATGTCAAAT

Bpm       AATGTCGATAATTGATATTATGTCAAAT
Bpm2      AATGTCGATAATTTACCTTATGTCAAAT

Bte       AATATTGATAATTGATATTATGTCAAAT
Bte2      AAGGTCGATAATTTACGTTATGTCAAAT

Bcn       AATGTCGATAATGTTGATTATGTCAATT
Bcn2      AAGGTCGATAATTCACGTTATGTAAAAT
Bcn3      AATGTCGATAATCAGCATTATGTCAAAT

Bur       CCTGTCGATAACTATGATTATGTCAAAT
Bur2      ATTGTCGATAATTCACGTTATGTAAAAT
Bur3      AAAATTGATCATAATCATTATGTAAAAT

Bvi       CCGACTGATAATAATGATTATGTCAAAT
Bvi2      CAGATTGATAATTCACGTTATGTAAAGT
Bvi3      CCGACCGATAATCCGCATTATGTAAAAT

Bxe       TAGGTTGATAATTTATATTATGTCAAAT
Bxe2      TATGTTGATAATTTATCTTATGTCAAGT
Bxe3      CATGTTGATAATTTATATTATGTCAAAT

Reh       AAAGCGCATAATGTATATTATGTTAAAT
Reh2      CCGGATGGGACTAAGTGTTATGTTAAAT

Rme       AATACCAATAATCTATCTTATGTTAAAT
Rme2      AATACATATAATGTATATTATGTTAAAT
```

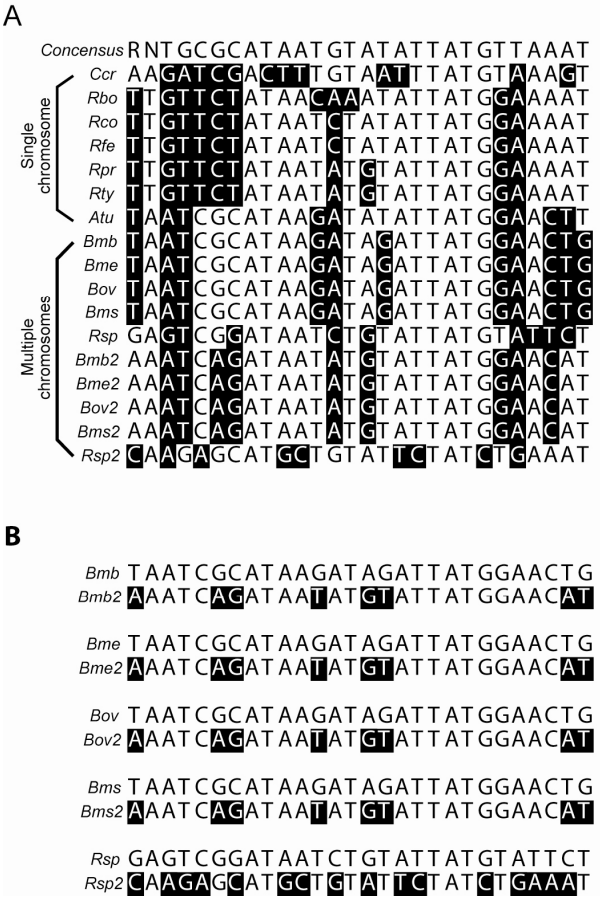
Supplemental data S2.
A. Alignment of the *dif* sites of b-Proteobacteria. Bases differing from the g-Proteobacteria consensus are shaded in black.
B. Pairwise alignment of *dif* sites harbored within the same bacterium. Divergent Bases are shaded.

Discussion

Dimer formation is linked to replicon size.

Many bacteria harbor multiple chromosomes, which seems an important determinant of their particular life styles. A few bacterial species harbor linear replicons in addition to circular, such as *Agrobacterium tumefaciens* and the *Borrelia* (Casjens, 1998). In the vast majority of cases, however, the multiple chromosomes harbored within a bacterium are circular. Maintenance of circular replicons requires the resolution of dimers created by homologous recombination events. The potential cumulative chances for topological problems to arise in bacteria with multiple circular chromosomes therefore suggested that CDR could be crucial for the maintenance of the complex genome organization of bacteria with multipartite genomes.

Here, we explored chromosome dimer resolution in the N16961 strain of *V. cholerae*, which harbors two circular chromosomes. The two chromosomes of this strain were known to carry distinct putative dimer resolution sites, *dif*1 and *dif*2, which are the target for a common pair of tyrosine recombinases, XerC and XerD (Figure 1C and 1D). We showed that the growth defect of *V. cholerae* cells deleted for *dif*1, *dif*2 or *xerC* is suppressed in a *recA*$^-$ background, confirming the idea that *dif*1, *dif*2 and XerC serve to resolve chromosome dimers (Figure 2). In addition, the growth defect of *xerC*$^-$ cells was entirely explained by the growth defects of cells deleted for *dif*1 and *dif*2, suggesting that dimer formation on the two chromosomes is independent (Figure 2).



Supplemental data S3.
A. Alignment of the *dif* sites of α–Proteobacteria. Bases differing from the γ–Proteobacteria consensus are shaded in black.
B. Pairwise alignment of *dif* sites harbored within the same bacterium. Divergent Bases are shaded.

In *V. cholerae*, we found that 5.8% of dimers per cell per generation are formed on the 2.96 Mbp chromosome I and that 3% of dimers are created on the 1.07 Mbp chromosome II (Figure 2). Under similar growth conditions, 15.6% of dimers are generated on the 4.6Mbp *E. coli* chromosome (Figure 6). These results suggest that dimer formation increases with replicon size, possibly reaching a theoretical upper limit of 50% for very large replicons. In addition, the rate of dimer formation seems to vary exponentially with replicon size for small replicons. Based on this hypothesis, the frequency of chromosome dimer formation in *V. cholerae* would be 11% per cell generation if it carried a single circular chromosome of 4.03Mbp. Instead, we measured a total rate of 8.6% for the two chromosomes (Figure 2). This could participate in the selection for the particular genomic organization of the Vibrios since minimizing chances for chromosome dimer formation is probably beneficial.

A common FtsK-dependent Xer recombination pathway manages non-homologous circular chromosomes in bacteria.

There are two possible pathways for Xer recombination, depending on whether XerC- or XerD-catalysis initiates the first pair of strand exchanges (Figure 1B). In *E. coli*, XerD initiates recombination at *dif* in the presence of FtsK whereas XerC initiates recombination at plasmidic or phage sites independently of FtsK. The central region of *dif*-related sites is an important determinant that influences the balance between these two recombination pathways (Figure 1C). The putative plasmidic origin of chromosome II (Heidelberg et al., 2000), the divergence of the central regions of *dif*1 and *dif*2 in strain N16961 (Figure 1C) and a previous report indicating that the exact mechanism of action of $XerD^{Vc}$ might differ from the one of its *E. coli* orthologue

(McLeod & Waldor, 2004) therefore raised the possibility that Xer recombination followed different pathways during CDR of the two *V. cholerae* chromosomes.

Here, we show that the strand exchanges catalysed by $XerC^{Vc}$ and $XerD^{Vc}$ occur at the junction between their respective binding site and the central region of *dif*1 and *dif*2 (Figure 3) and that $FtsK^{Vc}$ promotes recombination at both sites by activating a first pair of strand exchanges by XerD (Figure 4). In addition, we show that the activity of $FtsK^{Vc}$ is oriented by KOPS motifs and that the structure of chromosome I and II suits the role of $FtsK^{Vc}$ to bring CDR sites together when a dimer has been formed (Figure 6). We conclude that chromosome II dimers are resolved by the same *bona fide* chromosomal pathway than chromosome I dimers. This is remarkably different from the distinct replication initiation and chromosome partition mechanisms, which were found for each of the chromosomes bacteria may harbor (Yamaichi et al., 2007, Egan & Waldor, 2003, Dubarry et al., 2006).

We have previously shown in *E. coli* that the requirement for FtsK to activate Xer recombination delays CDR to the time of septum closure (Kennedy et al., 2008), which is likely to be true in *V. cholerae*. Thus, the study of CDR provides the first example of a cell cycle coordination mechanism shared by the two *V. cholerae* chromosomes, which is similar to the way chromosomal maintenance processes are coordinated with the cell cycle in eukaryotes.

Divergence of the central regions of the CDR sites harbored by non-homologous chromosomes serves to avoid chromosome hybrid formation.

The presence of *dif*-like sites at the junction of polarity of replichores on all the chromosomes of α-, β- and γ-Proteobacteria (Figure 7A) suggests that the adoption of an FtsK-dependent dimer resolution system is a key evolutionary step in the maintenance of large circular replicons. However, site-specific recombination

between identical sites harbored by non-homologous chromosomes would generate hybrids. We reasoned therefore that the divergent central regions harbored by the CDR sites of non-homologous chromosomes in bacteria with multipartite genomes probably serves to limit chromosome hybrid formation by Xer recombination, which could be necessary to maintain the genomic organization in these bacteria. Indeed, we showed that the resolution sites harbored by the two *V. cholerae* chromosomes can be brought together under normal growth conditions and could thus be recombined if they possessed identical central regions (Figure 7C).

The management of multiple CDR sites harbored by non-homologous chromosomes required co-evolution.

The sequence of the central region of *dif*-related sites can greatly influence the conformation switch that allows XerD to initiate strand exchanges in the presence of FtsK, which probably explains why this region is extremely well conserved in most β- and γ-Proteobacteria harboring a single chromosome (Figure 7A). The importance of this region is further supported by the inefficiency of recombination of *E. coli* XerCD at the non-canonical *dif*2 site (Figure 5B). Indeed, the efficiency of recombination at the divergent CDR sites harbored by the two *V. cholerae* chromosomes required the co-evolution of XerC, XerD and FtsK (Figure 5B). In addition, we found that the control exerted by FtsK on *dif*1- and *dif*2-recombination depends on a common substitution in the XerC-binding site of these sites compared to the γ-Proteobacteria consensus (Figure 5C). The same substitution is found in the XerC-binding site of the CDR sites of all the sequenced Vibrios (Figure 7A), suggesting that it occurred in their ancester. Interestingly, *dif* sites carried by other β- and γ-Proteobacteria with multiple chromosomes also carry specific substitutions in their central region and/or

in their XerC- and XerD-binding arms (Figure 7A), suggesting that co-evolution of the different CDR components also occurred in these bacteria.

Material and Methods

Strains, plasmids and media

All growth experiments were done in LB-Lennox. Strains and plasmids are listed in Supplementary Material and Methods. Briefly, *V. cholerae* strains were derived from N16961 (Heidelberg et al., 2000) by allele exchange using pDS132 derivatives (Philippe *et al.*, 2004) and *E. coli* β2163 as a donor strain (Demarre *et al.*, 2005). *E. coli* strains used for *in vivo* plasmid resolution assays and for growth competition were engineered as previously described in (Bigot et al., 2004, Yates et al., 2003). Mutations were confirmed by PCR and sequencing.

Growth competition assay

Growth competitions of *E. coli* strains are described in Bigot et. *al.* (2004). *E. coli* cells were grown at 37°C with a 1000x dilution in fresh media every 12h. Because of their higher growth rate, *V. cholerae* cells were grown at 30ºC with a 10000x dilution every 12h. The numbers of cfu of mutated and parental cells in the cultures were determined by plating on cognate antibiotic plates every 12 or 24h, depending on the mutant growth defect. These numbers were used to calculate the number of generation of the parent cells between each time points and the cfu ratio of mutated versus parent cells at each time point. This ratio varies exponentially with the number of generations. The proportion of cells that the mutant strain fails to produce at each doubling time of its parent is deduced from the coefficient of this exponential. This ratio is a good estimation of the rate of dimer formation (Supplementary Material and Methods).

***In vitro* Xer assays**

V. cholerae MBP-XerD and MBP-XerC recombinases were purified using nickel, amylose and heparin columns. The MBP tag was removed by thrombin digestion. *dif*1 and *dif*2 synthetic suicide substrates (Supplementary Material and Methods) were obtained by annealing synthetic oligonucleotides purified by PAGE. 5'-end labelling of oligonucleotides was performed using T4 DNA polynucleotide kinase and [^{32}P] γ-ATP and 3'end labelling using terminal transferase and [^{32}P] α-ddATP. Reactions were performed in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1 µg/ml of BSA, 40% glycerol and 0.2 pmol of radiolabeled probe for 2 hours at 37˚C. Covalent complexes were analyzed by 12% SDS-PAGE and cleavage sites by 12% urea-PAGE. Radioactivity was detected and quantitated on a STORM (GE Healthcare).

***In vivo* plasmid resolution assays**

E. coli cells were transformed with the FtsK expression vector and then with the Xer recombination reporter plasmid, as described in Yates et *al.* (2003). 10 transformant colonies were pooled in 1 ml of LB, diluted 100x in LB and grown to 0.6 OD. Cells were then grown for an extra 2 hours at 37ºC in the presence of 0.5% arabinose to induce FtsK production, unlesss otherwise indicated. Plasmid DNA was hydrolysed with Nde1 (single cutter). Recombination efficiency was computed as the amount of replicative product over the sum of the amount of substrate and of replicative product, which were separated by agarose gel electrophoresis and detected with SybrGreen staining using a LAS-3000 (Fuji Life Science).

Bioinformatics analysis of motifs distribution

Leading strands were defined as the DNA strand reported in Genbank files downstream of the replication origin up to the terminus and the reverse complement

strand from the terminus to the origin. The terminus position was chosen as the first nucleotide of the CDR site. Skew statistical significance was assessed by calculating the probability that the observed skew occurred by chance taking into account the fact that G-rich motifs are likely to be more frequent on the leading strand because of GC skew, as previously described (Halpern *et al.*, 2007). Analysis on chromosome II was performed on a chimeric chromosome where the superintegron has been removed because this element carries more than 100 repetitions of the *att*C integration site, which hides the signal provided by octamer motifs.

Supplementary Material and Methods

Plasmids and strains

Plasmids were checked by restriction digest and sequencing. *V. cholerae* strains were derived from the sequenced El Tor clinical isolate N16961 (Heidelberg et al., 2000). Mutations were made by allele exchange using derivative vectors of the R6K-ori-based suicide vector, pDS132 (Philippe et al., 2004) and using a strategy previously described (Srivastava et al., 2006). For cloning purposes, *E. coli* strain Π1 (*pir*+) was used as a plasmid host. For conjugal transfer of plasmids to *V. cholerae* strains, *E. coli* β2163 was used as donor strains (Demarre et al., 2005). The integration of the genes of interest was confirmed by PCR. *E. coli* strains used for *in vivo* plasmid resolution assays were derived from FX223, a *rec*F, *xer*C::*Gm*^{r} (gentamicin), *xer*D::*Km*^{r} (kanamycin) derivative of AB1157. Inactivation of the RecF pathway was particularly helpful in getting clear resolution patterns, as it abolishes most homologous recombination on plasmids (Kolodner *et al.*, 1985). The related *xer*C and *xer*D genes were introduced in place of the *xer*C::*Gm*^{r} allele using derivative vectors of the pKO3 plasmid (Link *et al.*, 1997). Derivatives of FX223 were

rendered *fts*K_C^- by phage P1-mediated transduction of *fts*K1, a Δ*fts*K_C::*Cm*^{r} allele that allows for the expression of a truncated form of the protein containing the N-terminal domain and two-thirds of the linker region (Diez *et al.*, 1997). *E. coli* strains used for growth competition assays were derived from LN2666. N, NLC^{Ec} and NLC^{Hi} have been previously described (Bigot et al., 2004, Yates et al., 2003). The *fts*K NLC^{Vc} alleles were cloned between two DNA segments corresponding to the upstream and downstream regions of the *fts*K ORF on the *E. coli* chromosome in an integration-excision vector derived from pLN135 (Cornet et al., 1996). A ΔLC allele tagged with a neo resistance gene (ΔLC-*Km*^{r}) was first introduced into strain LN2666. The resulting strain, FX97, was then used for the 'knock in' of the other *fts*K alleles and for reference strain in growth competition assay. Correct integration of the alleles was further verified by PCR on genomic DNA.

Plasmid and strain list

Name	Relevant genotype or features	Reference
***E. coli* strains**		
BL834	*E. coli* BL21 pLysS cells for protein expression	Lab stock
Π1	DH5α Δ*thy*A::(*erm*^{r}-*pir116*)	(Demarre et al., 2005)
β2163	(F-) RP4-2-Tc::Mu Δ*dap*A::(*erm*^{r}-*pir*)	(Demarre et al., 2005)
AB1157	*E. coli* K12	(Bachmann, 1972)
DS941	AB1157 *rec*F *143 lac*I^q *lac*ZM15	(Summers & Sherratt, 1988)
FX223	DS941 Δ*xer*D^{Ec}*::Km*^{r} Δ*xer*C^{Ec}*::Gm*^{r}	(Yates et al., 2003)
FX227	FX223 Δ*xer*C^{Ec}*::*(*xer*C^{Ec}- *xer*D^{Ec}) , Δ*fts*K$_C$::*Cm*^{r}	(Yates et al., 2003)
FX229	FX223 Δ*xer*C^{Ec}*::*(*xer*C^{Vc}- *xer*D^{Vc}) , Δ*fts*K$_C$::*Cm*^{r}	This study
MV5	FX223 Δ*xer*C^{Ec}*::*(*xer*C^{Vc}- *xer*D$_{YF}$^{Vc}) , Δ*fts*K$_C$::*Cm*^{r}	This study
MV6	FX223 Δ*xer*C^{Ec}*::*(*xer*C$_{YF}$^{Vc}- *xer*D^{Vc}) , Δ*fts*K$_C$::*Cm*^{r}	This study
MV7	FX223 Δ*xer*C^{Ec}*::*(*xer*C$_{YF}$^{Vc}- *xer*D$_{YF}$^{Vc}) , Δ*fts*K$_C$::*Cm*^{r}	This study
LN2666	W1485 Str^r *, leu* , *thy*A , *deo*B or C , *sup*E , *rps*L	(Cornet et al., 1994)
FX97	LN2666 Δ*fts*K$_C$^{Ec}::*Km*^{r}	(Bigot et al., 2004)
FX98	FX97 Δ*fts*KC^{Ec}::*Cm*^{r}	(Bigot et al., 2004)
FX99	FX97 Δ*fts*KC^{Ec}::C^{Ec}	(Bigot et al., 2004)
FX102	FX97 Δ*fts*KC^{Ec}::C^{Hi}	(Bigot et al., 2004)
MV1	FX97 Δ*fts*KC^{Ec}::C^{Vc}	This study
***V.cholerae* strains**		
CVC300	N16961 Str^r P$_{CP18}$ (*ara*E-*Km*^{r})	(Srivastava et al., 2006)
CVC301	N16961 Str^r P$_{CP18}$ *ara*E	(Srivastava et al., 2006)
MV25	CVC301 Δ*xer*C::*Sp*^{r}	This study
MV26	CVC301 Δ*rec*A::*Km*^{r}	This study
MV39	CVC301 Δ*dif*2::*Sp*^{r}	This study
MV45	CVC301 Δ*dif*1::*Sp*^{r}	This study
MV43	CVC301 Δ*xer*C::*Sp*^{r}, Δ*rec*A	This study
MV72	CVC301 Δ*dif*1::*Sp*^{r}, Δ*rec*A	This study
MV73	CVC301 Δ*dif*2:: *Sp*^{r}, *rec*A	This study
MV57	CVC301 Δ*xer*C:: *Sp*^{r}, Δ*lac*Z	This study
MV61	CVC301 Δ*xer*C:: *Sp*^{r}, Δ*lac*Z, Δ*dif*2::*lac*Z::*dif*1	This study
Plasmids		
pFX481	MBP-6His-XerD^{Vc} expression vector	This study
pFX483	MBP-6His-XerC^{Vc} expression vector	This study
pKO3	pSC101 *rep*AI(Ts), with *sac*B for allele exchange	(Link et al., 1997)
pFX381	pKO3 derivative for Δ*xer*C^{Ec}*::*(*xer*C^{Vc}- *xer*D^{Vc})	This study
pMEV19	pKO3 derivative for Δ*xer*C^{Ec}*::*(*xer*C^{Vc}- *xer*D$_{YF}$^{Vc})	This study
pMEV20	pKO3 derivative for Δ*xer*C^{Ec}*::*(*xer*C$_{YF}$^{Vc}- *xer*D^{Vc})	This study
pMEV21	pKO3 derivative for Δ*xer*C^{Ec}*::*(*xer*C$_{YF}$^{Vc}- *xer*D$_{YF}$^{Vc})	This study
pLN135	pSC101 *rep*AI(Ts), Δ*psi*, with *rps*L for allele exchange	(Cornet et al., 1996)
pFX399	pLN135 derivative for *fts*KC^{Ec}::C^{Vc}	This study
pDS132	R6Kori , *mobRP4* , with *sac*B for allele exchange	(Philippe et al., 2004)
pMEV68	pDS132 derivative for Δ*rec*A	This study
pMEV97	pDS132 derivative for Δ*rec*A::*Km*^{r}	This study
pMEV69	pDS132 derivative for Δ*lac*Z	This study
pMEV70	pDS132 derivative for Δ*dif*1	This study
pMEV71	pDS132 derivative for Δ*dif*2	This study
pMEV72	pDS132 derivative for Δ*xer*C	This study
pMEV184	pDS132 derivative for Δ*dif*2 ::*lac*Z ::*dif*1	This study
pMEV146	pSC101, *ori*TRP4 expressing *xer*C^{Vc}	This study
pFX170	pBAD :: *fts*K^{Ec} under P$_{ara}$ promoter	(Yates et al., 2003)
pFX380	pBAD :: *fts*K^{Vc} under P$_{ara}$ promoter	This study

pFtsK$^{Ec}_{50C[NRE]}$	pBAD :: *fts*K$^{Ec}_{50C[NRE]}$ under P_{ara} promoter	(Sivanathan et al., 2006)
pMEV206	pBAD :: *fts*K$^{Vc}_{[NRE]}$ under P_{ara} promoter	This study
pMEV43	pSC101::(*dif*Ec-*Cm*^{r}-*dif*Ec)	This study
pMEV173	pSC101::(*dif*1-*Cm*^{r}-*dif*1)	This study
pMEV170	pSC101::(*dif*2-*Cm*^{r}-*dif*2)	This study
pMEV174	pSC101::(*dif*12-*Cm*^{r}-*dif*12)	This study
pMEV175	pSC101::(*dif*13-*Cm*^{r}-*dif*13)	This study
pMEV169	pSC101::(*dif*14-*Cm*^{r}-*dif*14)	This study
pMEV39	pSC101::(*dif*15-*Cm*^{r}-*dif*15)	This study
pMEV176	pSC101::(*dif*23-*Cm*^{r}-*dif*23)	This study
pMEV172	pSC101::(*dif*1-*Cm*^{r}-*dif*2)	This study
pFX142(KOPS-0)	pSC101::(*dif*Ec-*Km*^{r}-*dif*Ec)	(Aussel et al., 2002)
pVS52(KOPS-2)	pFX142 with non permissive KOPS	(Sivanathan et al., 2006)

Growth competition assay

Very few cells carrying a dimer are expected to yield a viable progeny in the absence of CDR. Consequently, the proportion of cells that a mutant strain totally deficient in CDR fails to produce at each doubling time of its parent, which can be measured by growth competition experiments, gives a good estimation of the rate of chromosome dimer formation. This is true if the cell cycle of the mutant is not altered in the absence of dimers. This condition can be checked by measuring the growth defect of the mutated strain in a *rec*A context, in which no chromosome dimers can be formed by homologous recombination.

For growth competition of *E. coli* strains, the ratio of mutant and parental strains were determined every 20 generations (24 hours) by plating on chloramphenicol and kanamycin selective media. For growth competition of *V. cholerae* strains, the ratio of mutant and parental strains were determined by plating on spectinomycin and kanamycin selective media. The frequency of cells that a mutant strain fails to produce compared to its parent at each generation, f, equals $1-e^{-k}$, where k is the coefficient of the exponential describing the ratio of the mutant strain versus its parent, r, as a function of the number of generations, n ($r = e^{-kn}$).

In vitro Xer assays

G+A chemical cleavage of *dif* substrates were performed as described (Sambrook *et al.*, 1989).

Synthetic oligonucleotide list

Name	Sequence
B1	
482	CGCGTTCTAGAAGTGCGCATTATGTATGTTATGTTAAATGAGATCTGCG
483	CGCAGATCTCATTTAACATAACATACA
484	TAATGCGCACTTCTAGAACGCG
T1	
485	CGCGTTCTAGAAGTGCGCATTATGTATG
486	TTATGTTAAATGAGATCTGCG
487	CGCAGATCTCATTTAACATAACATACATAATGCGCACTTCTAGAACGCG
B2	
497	CGCGTTCTAGAAATGCGCATTACGTGCGTTATGTTAAATGAGATCTGCG
498	CGCAGATCTCATTTAACATAACGCACG
499	TAATGCGCATTTCTAGAACGCG
T2	
500	CGCGTTCTAGAAATGCGCATTACGTGCG
501	TTATGTTAAATGAGATCTGCG
502	CGCAGATCTCATTTAACATAACGCACGTAATGCGCATTTCTAGAACGCG

Data mining and phylogenic analysis

Observation of the *dif* sequences from the γ-Proteobacteria revealed that, although the XerD binding site is well conserved, the XerC binding site and the central region are more variable. This is especially true for those species with multiple chromosomes. As BLAST is generally insensitive to the position of conservation in short nucleotide sequences, it is a poor tool for identifying addition *dif* sequences in species from the α- and β-Proteobacteria sub-domains. Highlighting this fact is that the published *dif* site of *Caulobacter crescentus* is not readily identifiable by BLAST search (Jensen, 2006). A more sensitive and adapted approach involved the use of Hidden Markov Models (HMMs), and the program HMMER. We used CLUSTALW

(Thompson *et al.*, 1994) to format an alignment file of putative *dif* sequences from the larger chromosome of 27 γ-Proteobacteria (*Vibrio cholerae, Vibrio harveyi, Photobacterium profundum SS9, Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus CMCP6, Vibrio vulnificus YJ016, Vibrio fischeri, Shewanella oneidensis, Shewanella putrefaciens CN32, Shigella flexneri58401, Salmonella typhimurium LT2, Salmonella enterica ATCC9150, Shigella boydii Sb227, Shigella dysenteriae Sd197, Escherichia coli K12, ShigellasonneiSs046, Pseudomonas entomophila, Pseudomonas mendocina, Pseudomonas putida F1, Pseudomonas syringae DC3000, Pseudomonas stutzeri A1501, Haemophilus influenzae RdKW20, Xanthomonas campestris 8004, Pseudomonas aeruginosa PAO1, Pseudomonas fluorescens Pf-5, Pseudoalteromonas haloplanktis, Pseudoalteromonas atlantica*). This alignment was used to generate the WebLogo in Figure 1B. It also served to generate a profile using the program HMMER (Durbin, 1998). This allowed us to analyze in position-specific details which of the 28 base pairs of *dif* were most strongly conserved. The Markov Models (HMMs) were then used to search FASTA files of chromosomal replicons from completely sequenced bacteria. In most cases, the result of HMMSEARCH included multiple equivalent (>1e-4) hits with a single putative *dif* site yielding a more significant score (<1e-5).

As the *dif* sequence is found at the junction of the two replichores, GC-skew data was generated for each chromosome using the Genome Skew Program (Edelstein *et al.*, 2003). In most cases the highest scoring hit from HMMER fell within 10 Kb of the GC-skew inflection point. We further confirm that the identified sequence was not found within a gene, as it is always found in intergenic regions in γ-Proteobacteria. Finally, we compared each sequence by hand to insure proper spacing of XerD and XerC binding region and the 6-bp central region.

The complete list of the *dif* sites we found is shown in Figure S2, S3 and S4. We could thus demonstrate that the divergence of the central regions of the chromosomal dimer resolution sites of all α-, β- and γ-Proteobacteria harboring multiple replicons is a constant attesting that chromosomal fusions are certainly detrimental in the wild: when paired together, *dif* sites carried within the same bacterium displayed a mean of 2.59 changes in the 6 bp central region (for a total of 27 pairs), compared to 0.17 changes when *dif* sites carried by bacteria harboring a single chromosomes were paired with dif^{Ec} (for a total of 29 pairs).

Acknowledgments

We thank D.Chattoraj, D.Mazel, V.Sivanathan and D.Sherratt for the kind gift of plasmids and strains, G.Balavoine, N.Dubarry, B.Michel and C.Possoz for helpful comments. Work in the Barre laboratory is supported by FRM, EMBO YI, CNRS ATIP+ and ANR BLANC programs. M.-E.Val and L.Bonné were the recipients of FRM and Région Ile de France fellowships, respectively.

III. Résultats non publiés :

FTSK$_C$ POSSEDE UNE NOUVELLE FONCTION DANS LA SEGREGATION DES CHROMOSOMES CHEZ *V. CHOLERAE*

INTRODUCTION

Chez les bactéries, les processus de ségrégation des chromosomes et de division cellulaire peuvent être interdépendants. Notamment, la formation du septum de division joue un rôle essentiel dans l'ultime étape de résolution des dimères de chromosomes (Kennedy et al., 2008). Cette coordination est assurée par FtsK dont le domaine C-terminal (FtsKc) pompe l'ADN chromosomique du dimère au travers du septum de division jusqu'à mise en contact des deux sites *dif*, puis active la recombinaison (Aussel et al., 2002, Capiaux et al., 2002). Chez *E. coli,* la suppression du phénotype du mutant *fts*Kc- par l'inactivation de la recombinaison homologue montre que FtsKc sert à résoudre des produits de la recombinaison homologue, comme les dimères de chromosomes (Recchia et al., 1999). De plus l'absence de différence de croissance entre des mutants *xer*C et *ftsKc*- chez *E. coli* suggère que la fonction de translocation de l'ADN de FtsK est limitée à ce seul rôle dans des conditions de croissance normale (Bigot et al., 2004).

Cependant, la mobilisation de l'ADN par FtsK pourrait avoir un rôle plus général dans la partition des chromosomes (Barre, 2007). Par exemple, chez *B. subtilis*, SpoIIIE, un homologue de FtsK, agit sur tous les chromosomes lors de la sporulation. D'ailleurs chez *E. coli*, FtsKc semblerait jouer un rôle plus important dans

certains contextes génétiques particuliers. Par exemple, l'inactivation de MukB rend la fonctionnalité de FtsKc obligatoire à la survie des cellules (Yu *et al.*, 1998, Britton & Grossman, 1999) alors que celle de XerC et XerD ne l'est pas (Pérals et Barre, non publiés). MukB est un homologue fonctionnel des SMC (Structural Maintenance of Chromosome) et est impliqué dans la compaction et la ségrégation des chromosomes (Niki *et al.*, 1991, Danilova *et al.*, 2007). L'ADN nouvellement répliqué est réorganisé et condensé, via l'activité de MukB. En l'absence de compaction des chromosomes, il est possible que de l'ADN chromosomique soit si fréquemment piégé dans le septum de division que le rôle de FtsKc dans la distribution des chromosomes devienne essentiel. Similairement, un mutant *min*CD, où la septation est rendue asymétrique, produit des cellules anucléées. Dans un double mutant *fts*Kc- *min*CD, l'ADN reste coincé dans les minicellules, comme si FtsK était responsable de l'expulsion de l'ADN des minicellules dans le contexte *min*CD (Yu et al., 1998, Sharpe & Errington, 1995). On peut aussi différencier des souches *xer*C et *ftsK*c- lorsqu'on mute un gène qui permet le redémarrage des fourches de réplication, *pri*A (McCool & Sandler, 2001). Le mutant *pri*A présente des défauts de partition des nucléoïdes dans une sous-population de cellules dont la proportion est égale à celle retrouvée dans un mutant *dif*/*xer* (McCool & Sandler, 2001). Ce défaut de partition du mutant *pri*A dépend de la formation de crossover (McCool & Sandler, 2001). Par conséquent, l'inactivation de la résolution des dimères de chromosomes, qui dépend aussi de la formation de crossover, ne devrait pas affecter un mutant *pri*A. En effet, l'introduction des mutations *dif* ou *xer* dans un mutant *pri*A ne modifie pas signicativement le taux de cellules ayant un défaut de partition. Par contre, le double mutant *fts*Kc- *pri*A est létal (McCool & Sandler, 2001) ce qui signifie que

FtsKc a un rôle en dehors de la résolution des dimères de chromosomes dans un contexte génétique où PriA est inactivée.

D'autres études ont montrés que FtsK peut aussi intervenir dans l'activité de décaténation des chromosomes par interaction avec la TopoIV (Espeli et al., 2003b) (cf. Introduction). Cependant, le fait que l'activité de TopoIV soit essentielle alors que celle de FtsKc ne l'est pas, suggère fortement que la majeure partie des évènements de décaténation par la TopoIV ont lieu indépendamment de FtsKc. FtsKc pourrait aussi permettre de décaténer les chromosomes par activation de la recombinaison Xer à *dif* (Ip *et al.*, 2003). En effet, tout comme les chromosomes dimériques, les chromosomes intercaténés sont susceptibles de se retrouver au milieu de la cellule lors de la fermeture du septum de division. FtsK peut activer la recombinaison Xer à *dif* sur ces chromosomes enchainés, un caténat étant supprimé tous les deux évènements de recombinaison (Ip et al., 2003). Il a été montré que dans un contexte où l'activité de la TopoIV est réduite, le système Xer/FtsKc pouvait permettre de sauver les cellules (Grainge *et al.*, 2007). Qu'en est-il dans un contexte sauvage ? La mesure du taux de recombinaison Xer à *dif* lorsque RecA est inactivée conduit à environ 1% de recombinaison par cellule par génération, ce qui revient à dire que FtsK peut activer la recombinaison Xer en l'absence de formation de dimères dans 1% des cas (Kennedy et al., 2008) et ce taux pourrait correspondre à la présence de caténats réplicatifs résiduels au milieu de la cellule lors de la fermeture du septum.

Chez *E. coli,* l'inactivation de la résolution des dimères de chromosomes entraine un phénomène d'hyper-recombinaison dans la région du terminus de réplication du chromosome, probablement lié au piégeage de l'ADN des dimères au septum de division. L'ADN subit alors des lésions qui sont soumises au système de réparation par recombinaison homologue (Corre *et al.*, 2000, Corre et al., 1997,

Louarn *et al.*, 1994, Louarn *et al.*, 1991). Une étude montre que l'absence de FtsKc entraine un élargissement de ce domaine d'hyper-recombinaison terminale par rapport à un mutant *dif* ou *xer* (Corre & Louarn, 2005). En effet, le domaine sujet à l'hyper-recombinaison terminale est 4 fois plus grand dans un mutant *fts*Kc- (domaine FTSK) que dans un mutant *dif* (domaine DIF) (Corre & Louarn, 2005). De plus, la perturbation de la polarisation de l'ADN en dehors du domaine DIF, entraine le même effet d'hyper-recombinaison terminale qu'un mutant *fts*Kc- (Perals et al., 2000, Corre & Louarn, 2002, Corre & Louarn, 2005). Ainsi, les auteurs ont émis l'idée que l'activité de translocation polarisée de l'ADN par FtsK protège le domaine FTSK contre des évènements de recombinaison entre chromatides sœurs (Corre & Louarn, 2005). Par conséquent, le rôle de translocation de FtsKc pourrait être d'agir dans d'autres évènements tardifs de gestion des chromosomes.

L'ensemble de ces résultats obtenus chez *E. coli*, suggèrent que la translocation de FtsK a lieu sur l'ADN quand les chromosomes sont liés par des liens physiques tels que des dimères ou des caténats forçant l'ADN à passer au travers du septum lors de sa fermeture ou lorsque les chromosomes présentent un défaut de ségrégation comme par exemple un défaut de compaction de l'ADN dans un mutant *muk*B. Cependant dans un contexte normal chez *E. coli*, FtsKc semble n'être important que dans la résolution des dimères de chromosomes.

Dans un troisième volet de ma thèse, j'ai choisi d'aborder la question de la généralité de l'action de FtsKc dans la ségrégation des chromosomes en étudiant son rôle chez *V. cholerae*. En effet, il existe des différences notables entre *E. coli* et *V. cholerae*, qui autorisent à penser que l'étude de FtsKc chez ce dernier apportera de nouvelles informations :

– FtsK est nécessaire à la résolution des dimères des deux chromosomes chez *V. cholerae* en contrôlant la recombinaison à *dif*1 et *dif*2 (Val *et al.*, submitted). De plus des séquences de type KOPS sont retrouvées sur les deux chromosomes de *V. cholerae* et convergent vers les sites *dif,* ce qui suggère que la polarisation des deux chromosomes a une fonction aussi importante que chez *E. coli* (Val et al., submitted). Chez *E. coli*, même si elle s'ancre précocement dans le septum de division, FtsK n'est active pour résoudre les dimères de chromosome qu'au stade ultime de la clôture du septum de division (Kennedy et al., 2008). Si cela est aussi le cas chez *V. cholerae*, la résolution des dimères des chromosomes I et II de *V. cholerae* doit être synchrone.

– Des travaux de localisation cellulaire effectués chez *V. cholerae* par Srivastava et coll. ont montré que dans 50% des cellules, les terminus de réplication des chromosomes I et II sont co-localisés à centre de la cellule (Srivastava et al., 2006). Cette co-localisation suggère une coordination du terminus des deux chromosomes au moment de leur ségrégation. Il est envisageable que l'activité de translocation de FtsK joue un rôle dans cette coordination.

– Les deux chromosomes de *V. cholerae* suivent deux chorégraphies de ségrégation distinctes (Fogel & Waldor, 2005, Srivastava et al., 2006), ce qui suggère que l'action de FtsK est coordonnée à deux modes de ségrégation chromosomique différents. Le grand chromosome de *V. cholerae* se ségrége de manière asymétrique (Fogel & Waldor, 2005) comme le chromosome de *Caulobacter crescentus* (Jensen *et al.*, 2001). Chez *C. crescentus* le domaine C-terminal de FtsK est essentiel à la survie des cellules (Wang *et al.*, 2006), est-ce lié au mode de ségrégation asymétrique du chromosome ?

– La vitesse de croissance de *V. cholerae*, de près de deux fois plus rapide que celle de *E. coli*, implique une très forte coordination entre ségrégation des chromosomes et division cellulaire, suggérant encore que FtsK pourrait avoir un rôle plus important pour coordonner les étapes ultimes de ségrégation et de division cellulaire.

Mon étude montre que la délétion du domaine C-terminal de FtsK (*fts*Kc-) chez *V. cholerae* confère un phénotype filamenteux dramatique accompagné de défauts de ségrégation et d'un fort taux de mortalité. L'effet délétère de la mutation *fts*Kc- est plus important que celui de la mutation *xer*C et n'est pas lié à son rôle dans la septation. Ce résultat majeur montre qu'une fonction inconnue de FtsKc autre que la résolution des dimères de chromosomes chez *V. cholerae* est nécessaire dans un contexte sauvage. Je montre cependant que cette fonction reste liée à l'activité de recombinaison homologue. Cette fonction nécessite l'activité de translocation de l'ADN de FtsK mais pas la lecture polarisée de l'ADN, ni l'activation des recombinases Xer. Une mesure des évènements de recombinaison à *dif* sur les deux chromosomes dans un contexte génétique *rec*A-, nous a révélé que chez *V. cholerae*, FtsKc a accès à d'autres formes chromosomiques que les dimères lors de la fermeture du septum de division. Finalement, je mets en évidence que les deux chromosomes peuvent recombiner ensemble dans un contexte *rec*A- dépourvu de dimères de chromosome. Ceci suggère une co-localisation des terminus de réplication du petit et du grand chromosome au site de constriction du septum de division indépendamment de la formation de dimères.

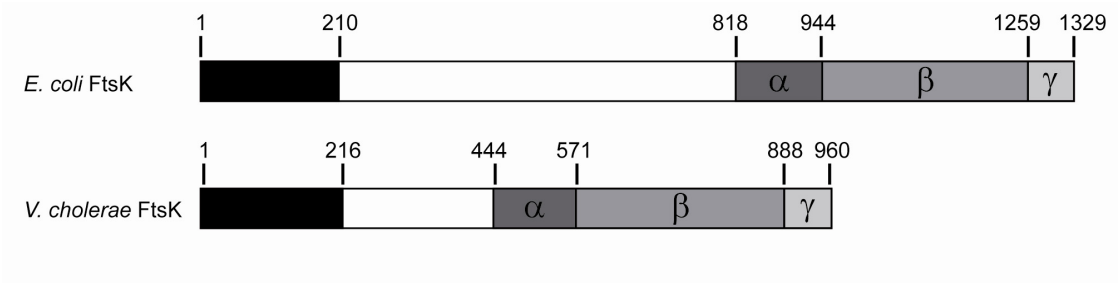


Figure 52. Représentation des protéines FtsK d'*E. coli* et de *V. cholerae*
Le domaine amino-terminal est représenté en noir, le domaine 'linker' en blanc et le domaine carboxy-terminal en gris. Les sous-domaines alpha, bêta et gamma du domaine carboxy-terminal sont indiqués : α, β, γ. La limite de chaque domaine est indiqué en acides aminés au-dessus de la protéine.

RESULTATS

Définition du domaine C-terminal de FtsK, FtsKc

Nous avons définis les domaines de FtsK de *V. cholerae* par comparaison de sa séquence protéique (ClustalW) avec celle de son homologue chez *E. coli* (Figure 52). Bien que la taille des protéines soit très différentes, 1329 aa pour *E. coli* et 960 aa pour *V. cholerae*, les deux protéines partagent 53% de similarité (Gonnet Matrix). Leur divergence s'explique principalement par la très faible conservation en taille et en séquence du domaine linker.

Le domaine C-ter de FtsK de *V. cholerae* présente une forte similarité, 84%, avec FtsKc de *E. coli*. Nous avons ainsi pu définir le domaine FtsKc de *V. cholerae* comme allant de la position 444 à 960 aa. Les trois sous-domaines α, β et γ de FtsKc de *V. cholerae* ont été défini ainsi:

- les domaines α [444-571] et β [572-888] portant des motifs de liaison de l'ATP de type Walker A et Walker B (Bigot et al., 2004) constituent le moteur de la protéine afin de transloquer l'ADN chez *E. coli* ;
- le domaine γ [889-960] qui chez *E. coli* interagit directement avec les KOPS (Sivanathan et al., 2006) et avec la recombinase XerD (Yates et al., 2006, Massey *et al.*, 2004) pour assurer deux fonctions complémentaires. Il permet la translocation orientée de l'ADN en se chargeant de manière orientée sur les KOPS (Bigot et al., 2006) afin de rapprocher les deux sites *dif* d'un dimère au septum puis il permet l'activation de la recombinaison par direct contact avec XerD (Massey et al., 2004, Yates et al., 2003, Yates et al., 2006).

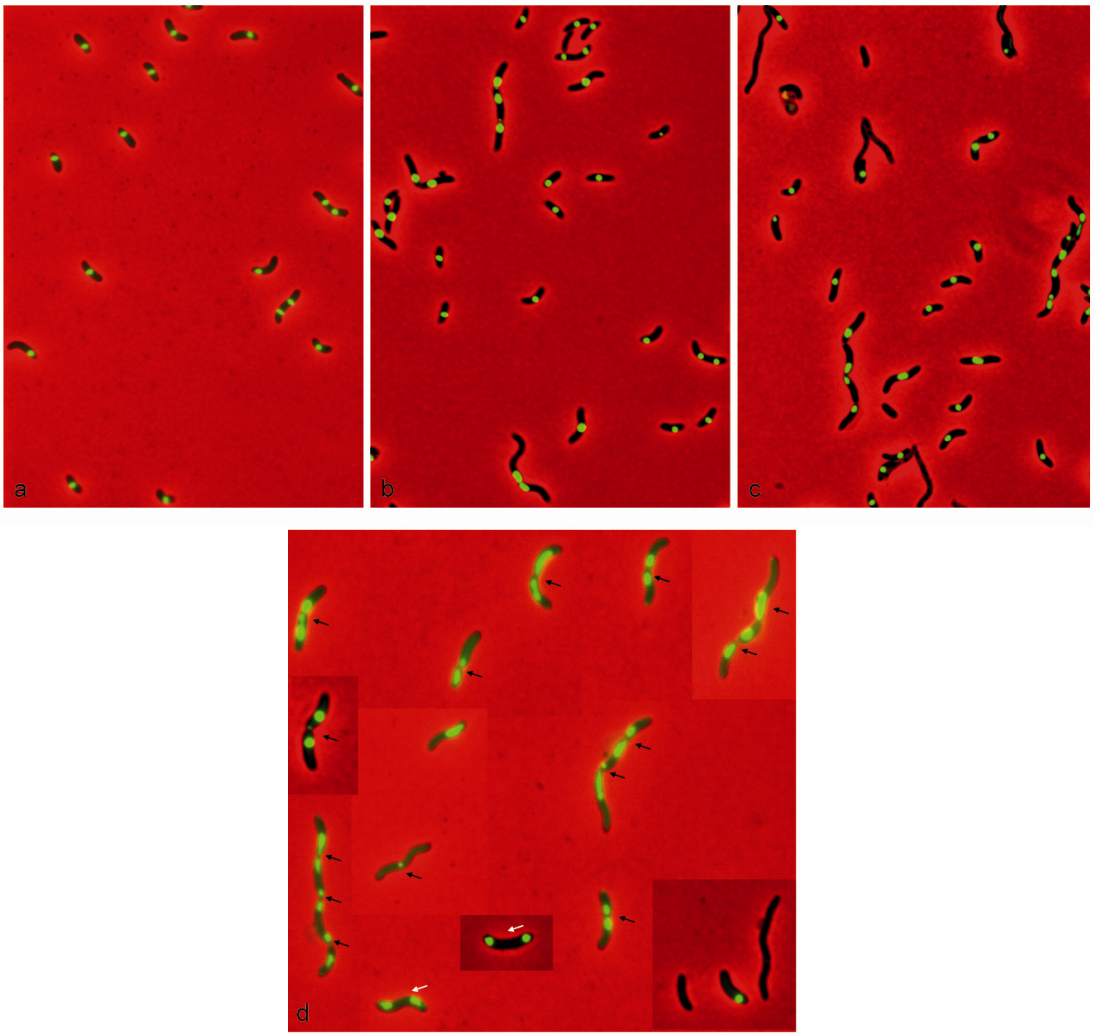


Figure 53. Problème dramatique de ségrégation du nucléoïde du mutant *fts*Kc-. Les cellules sauvages (a), *xer*C (b) et *fts*Kc- (c,d) sont cultivées en milieu M9 supplémenté de glucose (0,4%) jusqu'à DO 0,6. Les cellules sont ensuite traitées 3h au chloramphénicol (20 µg/mL), fixées et leur nucléoïde coloré au DAPI. Les cellules sont observées au microscope à l'objectif x100. Les photos en contraste de phase sont assignées au canal rouge et le DAPI au canal vert. Diverses photos des phénotypes observées du mutant *fts*Kc- ont été assemblées (d), les flèches noires indiquent un problème évident de ségrégation tandis que les flèches blanches montrent un profil de ségrégation normal des nucléoïdes.

Evidences pour une fonction additionnelle de FtsKc chez *V. cholerae*, en dehors de la résolution des dimères de chromosomes.

Chez *E. coli*, les mutants *dif* / *xer* contiennent une fraction de cellules filamenteuses présentant des problèmes de partition qui sont provoqués par la présence de dimères de chromosomes non résolus. Dans les mutants incapables de résoudre les dimères, le nucléoïde est piégé au septum de division et 'guillotiné' (Hendricks et al., 2000), engendrant ainsi l'induction de la réponse SOS, indicateur des dommages faits à l'ADN (Kuempel et al., 1991, Tecklenburg et al., 1995, Liu *et al.*, 1998, Hendricks et al., 2000). La réponse SOS entraine alors la filamentation des cellules (Hendricks et al., 2000). Chez *E. coli*, le mutant *fts*Kc- contient une portion de cellules filamenteuses présentant un défaut de partition similaire aux mutants *xer* ainsi qu'une fraction de cellules filamenteuses ne présentant pas de problème de partition et dont la filamentation est indépendante de la réponse SOS (Bigot et al., 2004). Ainsi, il a été suggéré que la délétion du domaine C-terminal de FtsK d'*E. coli* peut provoquer des problèmes de division cellulaire cependant ces problèmes n'engendrent pas de défaut de croissance par rapport à un mutant *xer* (Bigot et al., 2004).

Pour étudier le rôle de FtsKc chez *V. cholerae*, j'ai créé des mutants de délétion du domaine C-ter de FtsK [444-960] (*fts*Kc-) et de *xer*C afin de comparer leurs phénotypes. Les mutants *fts*Kc- de *V. cholerae* présente un phénotype filamenteux beaucoup plus marqué que les mutants *xer*C. Après condensation du nucléoïde au chloramphénicol (cf. Matériel et Méthodes) et coloration de l'ADN au DAPI, on peut observer un défaut net de partition des chromosomes dans un grand nombre de cellules *fts*Kc- avec de nombreux nucléoïdes trappés au septum de division et de nombreuses cellules anucléées (Figure 53 c,d). Ce défaut de ségrégation est nettement plus élevé que dans un mutant *xer*C traité dans les mêmes conditions

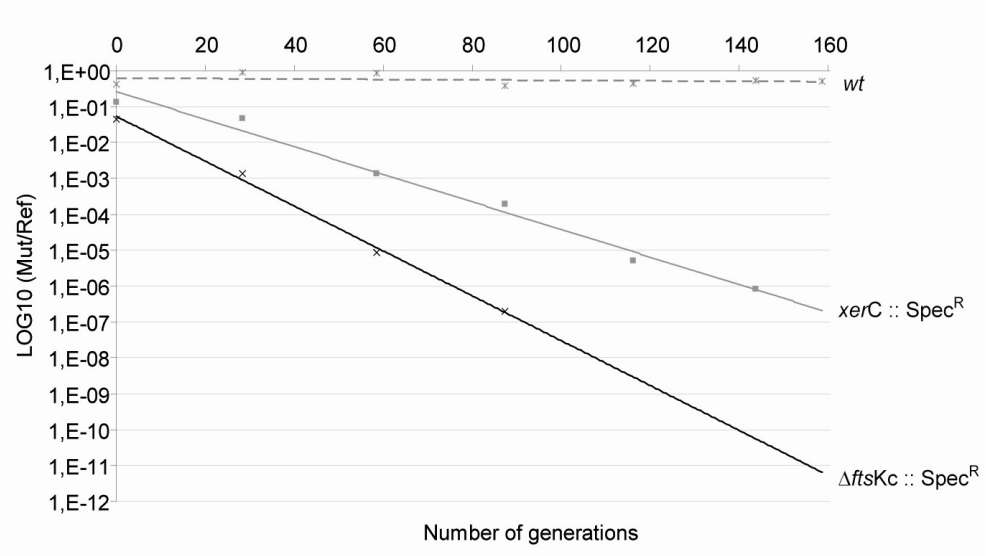


Figure 54. Le défaut de croissance du mutant *fts*Kc- est plus important que celui du mutant *xer*C.
Représentation graphique des compétitions de croissance entre des mutants *fts*Kc- et *xer*C par rapport à leur souche parentale sauvage. Le logarithme du ratio du nombre de mutants sur le nombre de sauvage est rapporté au nombre de génération réalisé par la souche sauvage. Le coefficient directeur de la droite de corrélation, k, permet de déterminer la fréquence de perte de prolifération du mutant par rapport à la sauvage et par génération, $f_{dimer} = 1-e^{-k}$. Les mutant *fts*Kc- et *xer*C ont une perte de croissance de 14% et 9% respectivement par génération, tandis que le contrôle sauvage ne présente aucun défaut de croissance.

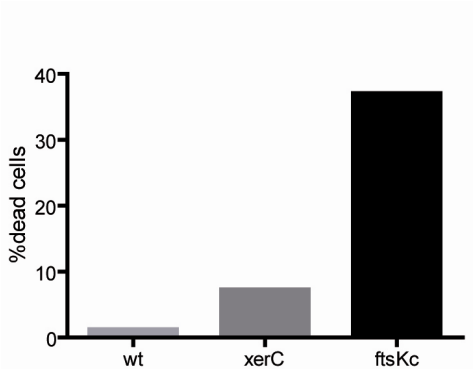


Figure 55. Le taux de mortalité du mutant *fts*Kc- est distinctement plus élevé que celui du mutant *xer*C.
Les cellules sont cultivées en LB jusqu'à une DO 0,6 puis elles sont colorées à l'aide du kit LIVE/DEAD (Invitrogen) : les cellules vivantes sont colorées en vert par le Syto9, les cellules mortes sont colorées en rouge par l'iodure de propidium. Le taux de cellules mortes et vivantes est déterminé par microscopie à fluorescence et représenté graphiquement sous forme d'histogrammes. Les taux de mortalité sont de 1,3% sur 1040 cellules sauvages analysées, 7,3% sur 330 cellules *xer*C analysées et 37,1% sur 302 cellules *fts*Kc- analysées.

(Figure 53 b). Afin de se donner une idée quantitative de l'effet dommageable de la délétion du domaine FtsKc par rapport à une délétion du gène *xer*C, j'ai effectué des essais de compétition de croissance (Perals et al., 2000). Les mutants *fts*Kc- ont un défaut de croissance plus important que les mutants *xer*C par rapport à leur souche parentale sauvage (Figure 54). Dans des conditions de croissance de laboratoire à 30ºC, la perte de prolifération du mutant *xer*C est de 9% par génération par rapport à la souche parentale sauvage. Ce taux correspond à la fréquence de formation de dimères de chromosome à chaque génération pour un mutant *xer*C (Val et al., submitted). La délétion de FtsKc conduit quant à elle à une perte de prolifération plus élevée de 14% par génération par rapport à la souche parentale sauvage. Afin de savoir si ce défaut de croissance du mutant *fts*Kc- est attribué à un plus fort taux de mortalité cellulaire ou un retard de croissance, j'ai mesuré le taux de viabilité des mutants *fts*Kc- et *xer*C par deux approches distinctes. La première approche consiste à compter le nombre de cellules vivantes et mortes après coloration LIVE / DEAD (Molecular Probes, Figure 55). La deuxième approche consiste à déterminer au microscope le nombre de cellules viables qui peuvent se diviser en microcolonies sur une lame recouverte d'une fine couche de milieu LB-agar (Figure 56) (Stewart & D'Ari, 1992). Les résultats obtenus par les deux approches sont consistants et montrent que le taux de mortalité du mutant *fts*Kc- est nettement plus important que le taux de mortalité du mutant *xer*C. Ceci suggère que le défaut de croissance des mutants *fts*Kc- observé en compétition de croissance est lié à un taux élevé de mortalité plutôt qu'à un retard de croissance. Afin d'analyser le devenir des filaments du mutant *fts*Kc-, j'ai examiné sous le microscope leur croissance en microcolonies. Les figures 56 (a et b) montrent des microcolonies produites par la souche sauvage de *V. cholerae*, dans laquelle les cellules se déploient dans une gamme normale de

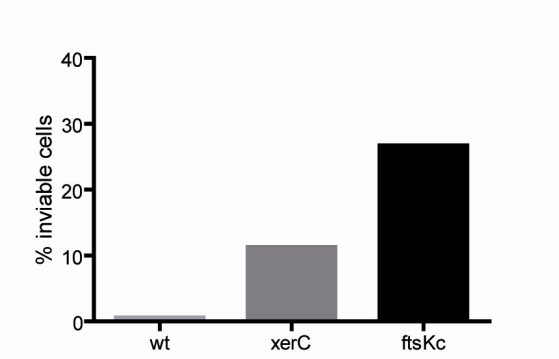


Figure 56. Le taux de cellules non viables du mutant *fts*Kc- est plus élevé que celui du mutant *xer*C.
La croissance des cellules sauvages et mutantes *fts*Kc- et *xer*C en microcolonies est observé sous le microscope sur une lame recouverte d'une fine couche de milieu LB-agar. Le calcul de la fraction de cellules non viables au sein d'une population est le nombre de cellules uniques divisé par la somme du nombre de cellules uniques et des microcolonies formées après incubation 2 heures à 37 ºC. Le taux de cellules ne formant pas de microcolonies est représenté graphiquement sous forme d'histogrammes. Les taux de cellules non viables sont de 0,6% sur 122 cellules sauvages analysées, 11,3% sur 159 cellules *xer*C analysées et 26,7% sur 146 cellules *fts*Kc- analysées.

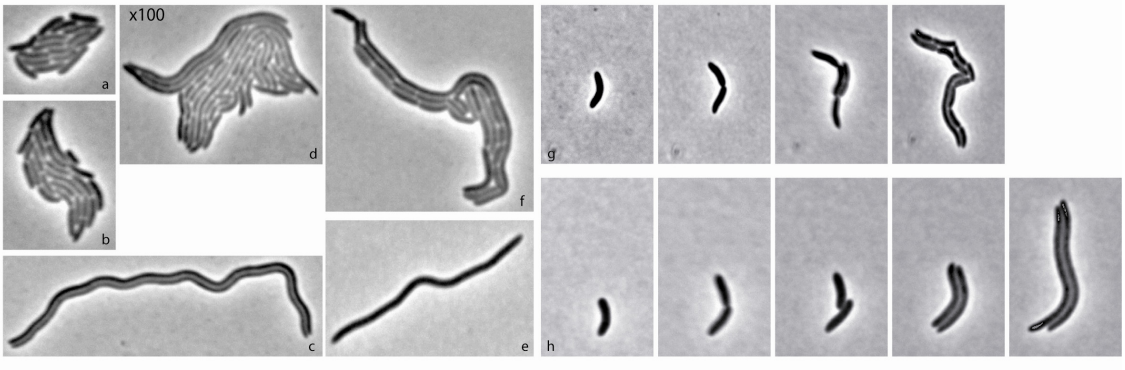


Figure 57. Analyse du profil de filamentation des mutants *xer*C et *fts*Kc- en microcolonies.
Microcolonies formées par des cellules sauvages (a,b) ; *xer*C (d) et *fts*Kc- (f). Les photos (c) et (e) illustre respectivement un 'twin-filament' formé par une cellule *xer*C et un filament isolé formé par une cellule *fts*Kc-. Les photos (g) et (h) ont été prises à intervalle de temps de 15 minutes. Elles illustrent la formation de filaments isolés après 3 cycles cellulaires dans une souche *fts*Kc- (g) et la formation de 'twin filaments' au premier cycle cellulaire d'une souche *xer*C (h).

tailles. Chez *E. coli*, les mutants exhibant un phénotype *dif* ou *xer* ont un profil caractéristique de croissance en microcolonies que l'on appelle 'twin filaments' (Hendricks et al., 2000). Le mutant *xer*C de *V. cholerae* présente des cellules exhibant le même profil 'twin filaments' que le mutant *xer*C d'*E. coli* (Figure 57 c) mais toutefois les filaments de *V. cholerae* sont beaucoup plus long. La formation de 'twin filaments' peut être visible au sein d'une microcolonie après plusieurs cycles cellulaires ce qui confère une allure hétérogène à la microcolonie (Figure 57 d). Pour le mutant *fts*Kc-, on observe à la fois des 'twin filaments' et des cellules qui s'allongent en filaments uniques (Figure 57 e). De tels filaments uniques peuvent provenir de cellules déjà mourantes qui ont eu un problème en culture liquide avant étalement sur LB-agar. Cependant on observe au sein de microcolonies du mutant *fts*Kc- l'apparition de filaments uniques nouvellement formés (Figure 57 g) tandis que l'autre cellule fille semble se diviser normalement au cycle cellulaire suivant. Ce phénomène est bien distinct des 'twin filaments'. L'hypothèse la plus probable est que l'une des deux cellules filles possède toujours l'entité de son génome nécessaire à sa survie et à sa croissance. Alors que lorsqu'un dimère de chromosome est non résolu, chacune des cellules filles a son chromosome endommagé par la fermeture du septum d'où la formation de 'twin filaments' (Figure 57 h).

Les domaines α, β de FtsK et l'hydrolyse de l'ATP sont indispensables pour la nouvelle fonction de FtsKc

Afin d'identifier les domaines de FtsKc impliqués dans la nouvelle fonction de FtsK préalablement mise en évidence, nous avons tenté de complémenter le phénotype malade du mutant *fts*Kc- par divers mutants de FtsK sur plasmide. L'introduction d'un

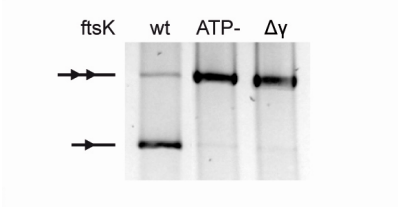


Figure 58. L'activité ATPase et le domaine γ de FtsK de *V. cholerae* sont nécessaire à l'activation de la recombinaison Xer.
Mesure *in vivo* de la recombinaison Xer sur plasmides portant deux sites *dif* en répétitions directes. La recombinaison entre les deux sites *dif* entraine l'excision du fragment central. Les cellules sont cultivées jusqu'à DO 0,6 avant induction de FtsK (0,5% arabinose) pendant 3 heures. L'ADN plasmidique est alors extrait et linéarisé par digestion enzymatique. Les produits de recombinaison sont séparés sur gel d'agarose (1%) et coloré au SybrGreen. Un schéma du substrat et du produit de recombinaison est dessiné à coté du gel, le site *dif* étant représenté par ►. FtsK sauvage est nécessaire pour activer la recombinaison entre les deux sites *dif* (wt). L'absence de produit de recombinaison démontre que les mutants $FtsK_{ATP-}$ (ATP-) et FtsKγ- (Δγ) sont déficients pour activer la recombinaison Xer.

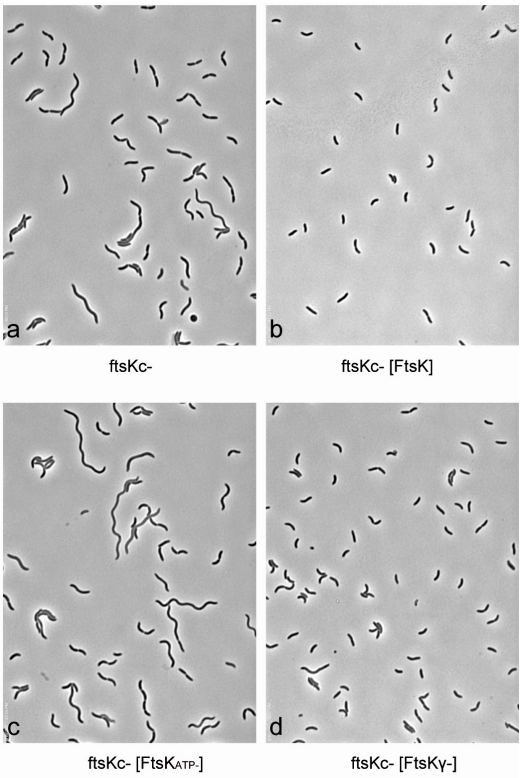


Figure 59. Complémentation du mutant *fts*Kc- par divers variants de FtsK.
La souche *fts*Kc- (a) est conjuguée par des plasmides exprimant la protéine sauvage de FtsK (b), la protéine FtsK dépourvue de son activité ATPase (c) et la protéine FtsK tronquée *fts*Kγ- (d). Les cellules sont cultivées en milieu M9 supplémenté de glucose jusqu'à DO 0,6, fixées puis observée au microscope en contraste de phase. La souche *fts*Kc- [FtsK] présente un phénotype sauvage (b). La souche *fts*Kc- [$FtsK_{ATP-}$] présente le même profil malade (c) que le mutant *fts*Kc- sans plasmide (a). La souche *fts*Kc- [FtsKγ-] montre beaucoup moins de filaments (d) que le mutant *fts*Kc-.

plasmide codant pour la version sauvage de FtsK complémente totalement le phénotype du mutant *fts*Kc- (Figure 59b, 61).

Chez *E. coli*, l'activation de la recombinaison Xer et la translocation de l'ADN nécessite l'activité ATPase de FtsKc. Des différences phénotypiques entre un mutant *fts*Kc- et *fts*K_{ATP-} ont été observé chez *E. coli*, ce premier présentant des filaments indépendant du SOS (Bigot et al., 2004). Ces résultats ont suspectés un impact de la mutation *fts*Kc- sur la division cellulaire. Toutefois, la mutation *fts*Kc- n'entraine pas un défaut de croissance plus important que la mutation *fts*K_{ATP-} chez *E. coli*. Il est envisageable que la délétion du domaine FtsKc chez *V. cholerae* puisse provoquer des problèmes de division cellulaire qui serait visiblement plus néfastes. Afin de vérifier cette hypothèse chez *V. cholerae*, j'ai introduit une mutation ponctuelle [K624A] dans le motif AAA du walker A de FtsK. J'ai vérifié que cette mutation ponctuelle inactive la recombinaison Xer comme chez *E. coli*, en utilisant un système rapporteur plasmidique contenant deux sites *dif* en répétition directe (Yates et al., 2003). L'absence de produit de recombinaison avec FtsK_{ATP-} démontre que la mutation ponctuelle du motif walker A de FtsKc de *V. cholerae* inactive bien la recombinaison Xer (Figure 58, ATP-). L'introduction d'un plasmide codant pour la protéine FtsK_{ATP-} dans le mutant *fts*Kc- ne semble pas complémenter le phénotype filamenteux des cellules (Figure 59 c). La visualisation des nucléoïdes colorés au DAPI nous montre que le taux de cellules ayant leur nucléoïdes piégés au septum et le taux de cellules anucléées est équivalent au mutant *fts*Kc- sans plasmide (Figure 60). Finalement, en compétition de croissance, la souche *fts*Kc- [FtsK_{ATP-}] a un défaut de croissance équivalent au mutant *fts*Kc- sans plasmide (Figure 61). La protéine FtsK_{ATP-} ne complémente donc pas le phénotype du mutant *fts*Kc-. Ces

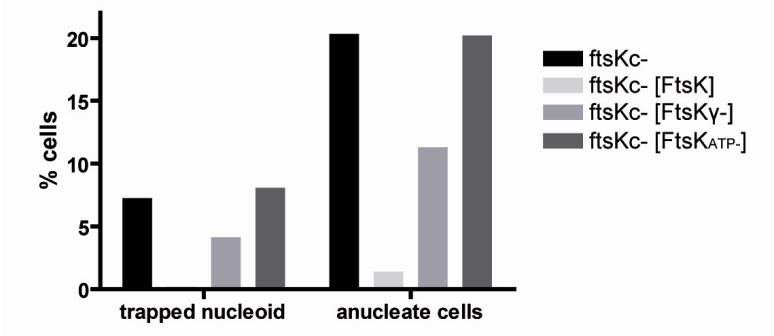


Figure 60. Le défaut de ségrégation du mutant *fts*Kc- est atténué par l'expression de FtsKγ-.
Les conjuguants *fts*Kc- contenant le plasmide exprimant les protéines FtsK, $FtsK_{ATP-}$ et FtsKγ- sont cultivées en milieu M9 supplémenté de glucose jusqu'à DO 0,6. Les cellules sont ensuite traitées 3h au chloramphénicol (20 µg/mL), fixées et leur nucléoïde coloré au DAPI. Les cellules sont ensuite observées au microscope. Le nombre de cellules ayant leurs nucléoïdes trappés au septum et le nombre de cellules anucléées observé dans un champ de vision sont rapportés au nombre total de cellules du champ. Ces taux sont reportés graphiquement en histogramme. Le nombre de cellules analysées est 689 pour *fts*Kc-, 924 pour *fts*Kc- [FtsK], 1256 pour *fts*Kc- [FtsKγ] et 914 pour *fts*Kc- [$FtsK_{ATP-}$].

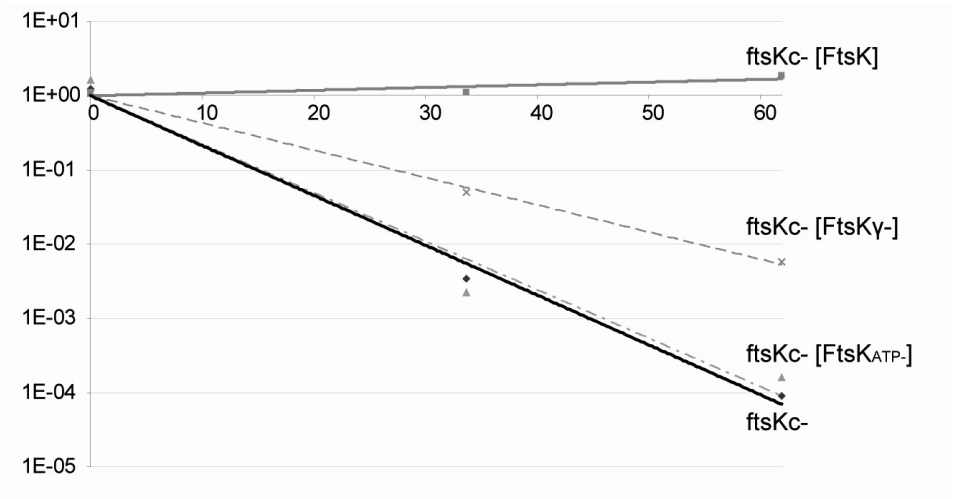


Figure 61. L'hydrolyse de l'ATP est indispensable pour assurer la fonction inconnue de FtsKc mais pas le domaine γ.
Représentation graphique des compétitions de croissance entre les souches *fts*Kc- portant les plasmides exprimant FtsK, $FtsK_{ATP-}$, FtsKγ- et les souches parentales sauvages portant les mêmes plasmides. Les défauts de croissance sont de 15% pour la souche *fts*Kc- sans plasmide, 15% pour la souche *fts*Kc- [$FtsK_{ATP-}$], et 8% pour la souche *fts*Kc- [FtsKγ-] par rapport à la souche parentale. La souche *fts*Kc- [FtsK] montre un léger gain de croissance de 1% par rapport à la souche parentale que l'on considère comme étant non significatif.

résultats démontrent que l'activité ATPase du FtsKc joue un rôle important dans la nouvelle fonction de FtsK. Chez *E. coli*, l'absence de différence phénotypique entre un mutant *fts*Kγ- and *fts*Kc- démontre que l'activité de translocation de FtsK n'est impliquée que dans l'activation de la recombinaison Xer. J'ai créé un mutant tronqué FtsKγ- [889-960] de *V. cholerae* sur plasmide d'expression. L'absence de produit de recombinaison à *dif* sur plasmide avec FtsKγ- nous permet de confirmer que le domaine γ de FtsK est bien nécessaire à la recombinaison Xer chez *V. cholerae* (Figure 58, Δγ). Après introduction du plasmide FtsKγ- dans le mutant *fts*Kc-, le taux de cellules filamenteuses diminue (Figure 59 d). Les taux de cellules anucléées et de cellules ayant leur nucléoïde trappé au septum diminuent également. Ces taux sont néanmoins toujours élevés comparativement au mutant *fts*Kc- complémenté par la protéine FtsK sauvage (Figure 60). En compétition de croissance, le mutant *fts*Kc- [FtsKγ-] a un défaut de croissance amoindri par rapport au mutant *fts*Kc- sans plasmide (Figure 61) ce qui montre que l'ajout des domaines α et β permet de rétablir partiellement la viabilité du mutant *fts*Kc-. Le défaut de croissance de la souche *fts*Kc- [FtsKγ-] semble être proche du défaut de croissance d'un mutant *xer*C. Pour vérifier cela j'ai introduit une délétion du domaine γ [889-960] de FtsK chez *V. cholerae*. En compétition de croissance, le mutant *fts*Kγ- a une perte de prolifération semblable à celle du mutant *xer*C (Figure 62). Le domaine FtsKγ de *V. cholerae* semble donc avoir un rôle limité à l'activation de la recombinaison Xer chez *V. cholerae* et un double mutant ftsKγ-, *xer*C devrait nous permettre de vérifier ceci. L'ensemble de ces résultats démontrent que les domaines α et β ainsi que leur activité ATPase jouent un rôle majeur dans la nouvelle fonction inconnue de FtsKc et suggèrent que cette fonction est par conséquent liée à son activité de translocation de l'ADN.

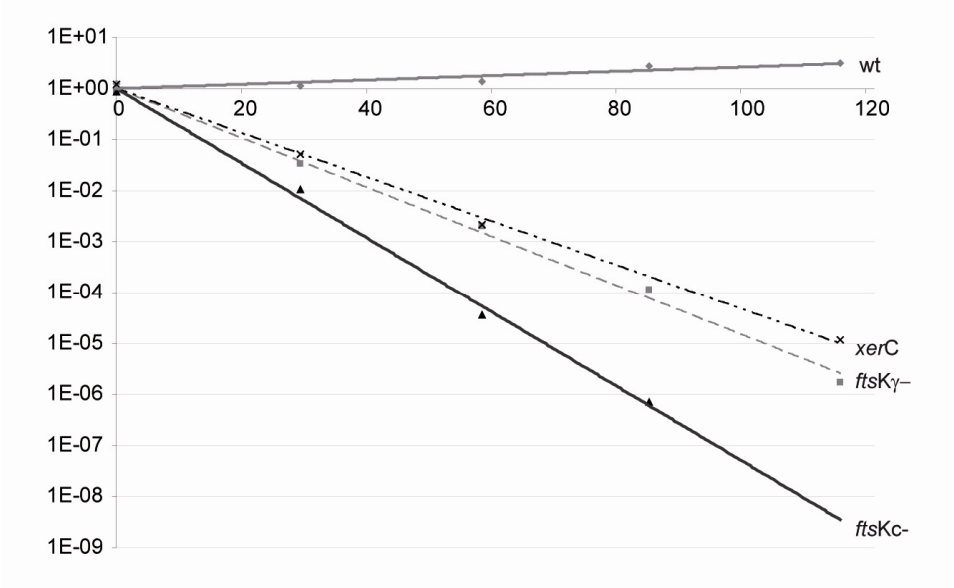


Figure 62. Le domaine γ de FtsK a un rôle limité à la résolution des dimères de chromosomes.
Représentation graphique des compétitions de croissance entre les souches sauvage, *fts*Kc-, *fts*Kγ-, *xer*C et leurs souches parentales sauvages. Les défauts de croissance de la souche *fts*Kγ- et de la souche *xer*C- diffèrent de seulement 1%.

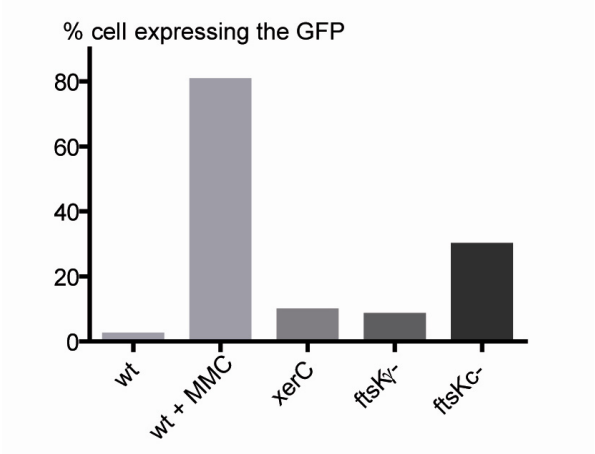


Figure 63. L'induction de la réponse SOS est plus forte dans un mutant *fts*Kc- que dans un mutant *xer*C et *fts*Kγ-.
Le gène de la GFP est placé sous un promoteur inductible par le SOS. Le taux de cellules exprimant la GFP par conséquent induisant une réponse SOS est déterminé par microscopie à fluorescence. Ce taux est reporté graphiquement en histogramme pour la souche sauvage (traité et non traité à la mitomycine C) et les souches mutantes *xer*C, *fts*Kγ- et *fts*Kc-. Le taux de cellules exprimant la GFP est de 2% sur 296 cellules sauvages non traitées, 80% sur 681 cellules sauvages traitées à la mitomycine C, 9 % sur 867 cellules *xer*C analysées, 8% sur 184 cellules *fts*Kγ- analysées et 30% sur 182 cellules *fts*Kc- analysées.

Le nombre de cellules ayant leur nucléoïde trappé au septum est important dans le mutant *fts*Kc-. Chez *E. coli*, le guillotinage des dimères de chromosomes par le septum de division fait des dommages à l'ADN ce qui déclenche une réponse SOS (Hendricks et al., 2000, Liu et al., 1998). J'ai introduit dans les souches sauvages, *xer*C, *fts*Kγ- et *fts*Kc- le gène GFP sous le contrôle du promoteur de l'intégrase du superintégron dont l'expression est réprimée par LexA (Cambray G. et Mazel D., non publiés). Pour valider ce système rapporteur de SOS, j'ai induit chimiquement la réponse SOS en traitant la souche sauvage à la mitomycin C (MMC) (Keller *et al.*, 2001, Quinones *et al.*, 2006). J'ai ensuite déterminé le nombre de cellules exprimant la GFP par microscopie, reflétant le nombre de cellules induisant le SOS (Figure 63). Alors que la souche sauvage non traitée à la MMC présente une expression de la GFP quasi-nulle, environ 80% des souches sauvages traitées à la MMC expriment la GFP. Ce système rapporteur de SOS est donc fonctionnel. L'analyse des différents mutants montrent qu'environ 9% des mutants *xer*C, 8% des mutants *fts*Kγ- et 30% des mutants *fts*Kc- expriment la GFP. Le pourcentage de mutants *fts*Kγ- induisant le SOS étant quasi-équivalent au pourcentage de cellules induisant le SOS dans le mutant *xer*C, nous pouvons attribuer ces cellules aux dimères de chromosomes non résolus. Le taux de SOS du mutant *fts*Kc- reflète une proportion plus importante de dommages faits à l'ADN qui est certainement le reflet du taux élevé de problème de ségrégation des chromosomes.

L'inactivation de la recombinaison homologue catalysée par RecA rétablit totalement la viabilité des mutants *fts*Kc-

Chez *E. coli*, les dimères de chromosomes sont catalysés par RecA. RecA a deux fonctions connues : elle active la recombinaison homologue et la réponse SOS. Afin

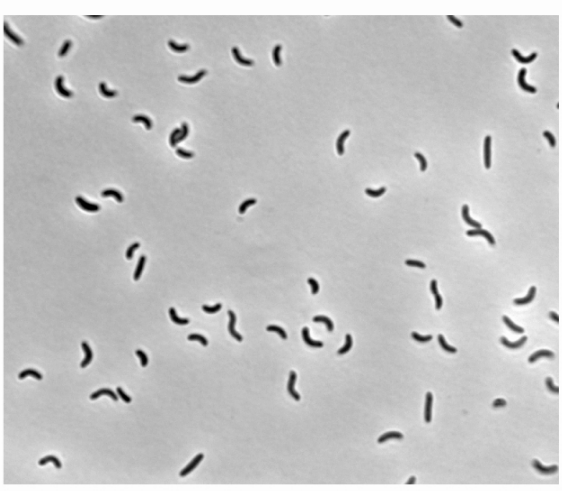


Figure 64. L'inactivation de RecA supprime le phénotype filamenteux du mutant *fts*Kc-.
Le double mutant *fts*Kc- *recA* est cultivé en milieu M9 supplémenté de glucose jusqu'à DO 0,6, les cellules sont fixées et observées au microscope en contraste de phase. L'absence nette de filaments montre une suppression de l'effet délétère de la mutation *fts*Kc-.

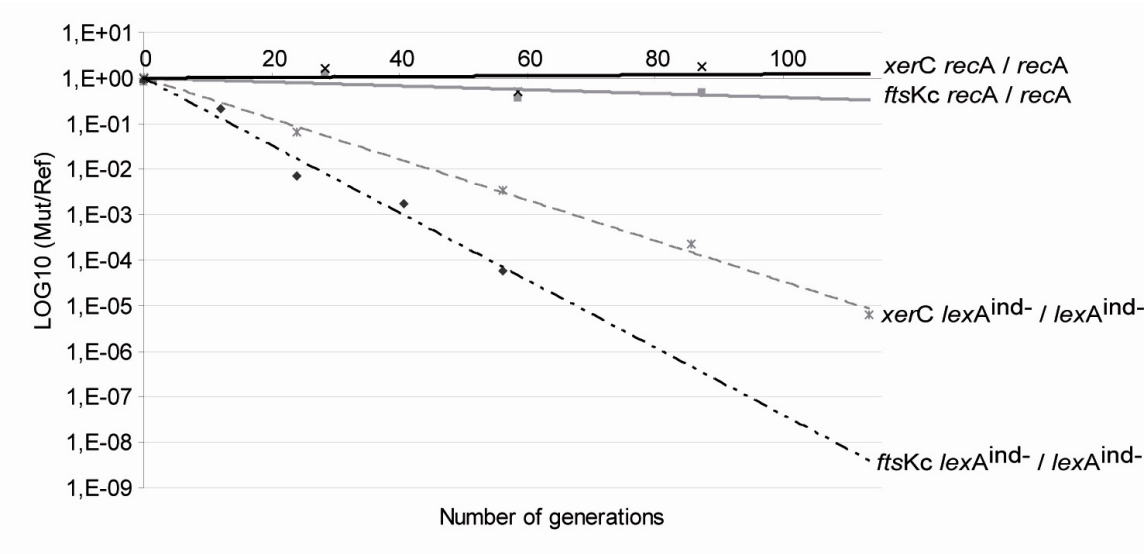


Figure 65. L'inactivation de l'activité de recombinaison homologue de RecA supprime l'effet délétère de la mutation *fts*Kc-.
Représentation graphique des compétitions de croissance entre les double mutants *xer*C *recA*, *fts*Kc- *recA* et leurs souche parental *recA* et entre les doubles mutants *xer*C *lexA*$^{ind-}$, *fts*Kγ- *lexA*$^{ind-}$ et leurs souches parentales *lexA*$^{ind-}$. Le défaut de croissance des mutants *xer*C et *fts*Kc- est supprimé par la délétion de *recA*, mais pas par la mutation *lexA*$^{ind-}$.

de discriminer ces deux fonctions, on introduit communément une mutation *lexA*$^{ind-}$ qui empêche le clivage du répresseur transcriptionnel LexA par RecA et par conséquent l'induction de la réponse SOS, sans pour autant inactiver la recombinaison homologue. Par exemple, la perte de prolifération des mutants *dif*, *xer* et *fts*Kc- est abolie dans un contexte *rec*A mais pas *lexA*$^{ind-}$ (Recchia et al., 1999), conformément au fait que chez *E. coli*, le système *dif* / Xer / FtsK sert à la résolution des dimères qui sont formés par recombinaison homologue. Chez *V. cholerae*, l'inactivation de RecA supprime le défaut de croissance des mutants *dif*1, *dif*2 et *xer*C par rapport à une souche *recA* (Val et al., submitted). Par contre, comme FtsKc joue un rôle en plus de la résolution des dimères de chromosomes, l'inactivation de RecA ne devrait restaurer que partiellement le défaut de croissance du mutant *fts*Kc-, à condition que l'autre fonction de FtsKc ne soit pas aussi liée à l'activité de RecA. Au microscope le double mutant *rec*A *fts*Kc- présente un phénotype sauvage (Figure 64). En compétition de croissance, l'inactivation de RecA dans le mutant *fts*Kc- permet d'annuler totalement le défaut de croissance du mutant (Figure 65) par rapport à une souche *rec*A. L'autre fonction de FtsKc est donc aussi liée à l'activité de RecA. Ce résultat suggère que la mutation *fts*Kc- n'engendre pas de problèmes de division cellulaire car son phénotype est entièrement lié à l'activité de RecA. Afin de distinguer entre les deux fonctions de RecA, recombinaison homologue ou induction du SOS, j'ai introduit une mutation *lex*A^{ind-} (Quinones et al., 2005) dans le mutant *fts*Kc-. En compétition de croissance, l'inactivation du SOS ne supprime pas le défaut de croissance du mutant *fts*Kc- (Figure 65). La viabilité du mutant *fts*Kc-*rec*A résulte donc de la perte de la fonction de RecA mais pas de celle du SOS. Ces résultats suggèrent que la viabilité du mutant *fts*Kc- *rec*A est due à l'inactivation de la recombinaison homologue même si nous ne pouvons pas exclure que RecA ne

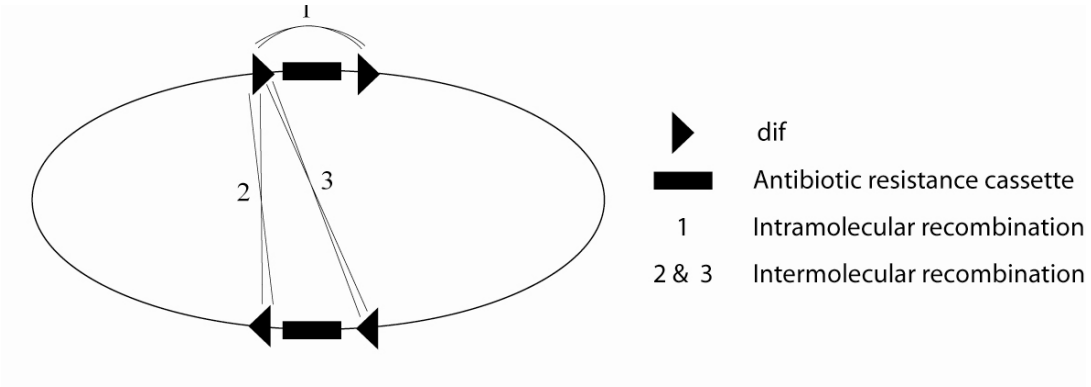


Figure 66. Représentation schématique de l'essai de recombinaison à *dif* sur chromosome.
Deux sites *dif* en répétition directe, flanquant une cassette de résistance, sont introduits au locus *dif*1 du grand chromosome ou *dif*2 du petit chromosome. Le schéma représente le cas de figure de la formation d'un dimère de chromosome avec trois voies possibles de recombinaison sont envisageables. La voie 1 consiste en la recombinaison entre deux sites *dif* adjacents, elle peut avoir lieu au sein d'un monomère ou d'un dimère. Les voies 2 et 3 consistent en des évènements de recombinaison nécessitant obligatoirement la formation d'un dimère de chromosome.

catalyse pas le clivage d'autres répresseurs que LexA, tel qu'on le connait pour les répresseurs de bactériophages ou la protéine UmuD (Perry *et al.*, 1985).

FtsK transloque sur des chromosomes monomériques chez *V. cholerae*

Il est possible de mesurer directement la fréquence de recombinaison Xer à *dif* sur le chromosome en insérant au locus de *dif* deux sites *dif* en répétition directe flanquant une cassette de résistance à un antibiotique (Perals et al., 2000). L'action du système Xer / FtsK sur les deux sites *dif* génère l'excision de la cassette donnant lieu à des cellules présentant un phénotype sensible pour l'antibiotique (Figure 66). En utilisant cet essai chez *E. coli*, la fréquence de recombinaison à *dif* est de 12% par génération (Perals et al., 2000, Kennedy et al., 2008) ce qui correspond à peu près au taux de formation des dimères de chromosomes (Perals et al., 2000). Dans un contexte *rec*A, où il n'y a pas formation de dimère de chromosome, la fréquence d'excision de la cassette chute à 1% par génération (Perals et al., 2001, Kennedy et al., 2008). Vue que la recombinaison intramoléculaire entre les deux sites adjacents est structurellement possible (Figure 66 – voie 1), ce résultat démontre que l'excision de la cassette est quasiment entièrement dépendante de la formation de dimères (Figure 66 – voie 2 & 3) qui sont présents au septum lors de l'activation de FtsK dans la recombinaison Xer. J'ai introduit chez *V. cholerae* le même système d'excision de cassette aux locus *dif*1 et *dif*2 du mutant *fts*Kc- afin d'établir directement la fréquence de recombinaison Xer à *dif*1 et *dif*2. La fonction de FtsK d'activation de la recombinaison Xer est restaurée par conjugaison d'un plasmide à faible nombre de copie dérivé de pSC101 et exprimant la protéine FtsK sous son promoteur naturel. L'activité de résolution de la cassette est mesurée par étalement sur des boites de sélection appropriée. La fréquence de perte de la résistance à l'antibiotique est

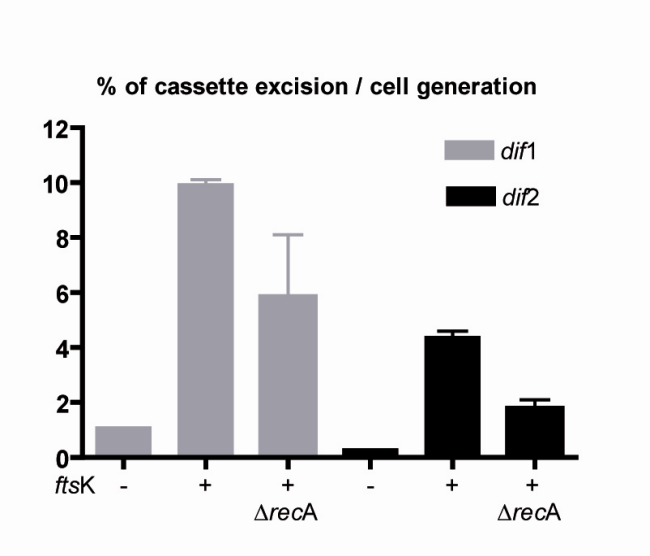
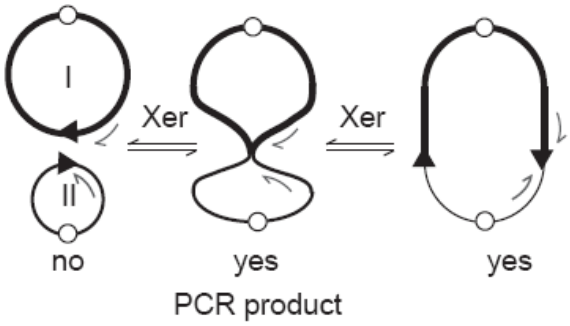


Figure 67. FtsK active la recombinaison Xer indépendamment de la formation de dimères de chromosomes.
Les fréquences de recombinaison à *dif*1 et *dif*2 sont reportées sous la forme d'histogramme. L'essai est réalisé dans un mutant *fts*Kc- et un double mutant *fts*Kc-*recA* (Δ*recA*) avec (+) ou sans (-) FtsK exprimé sur plasmide.

calculée par rapport au nombre de générations réalisées après conjugaison du plasmide exprimant FtsK (c.f. Matériel et Méthodes). Les résultats obtenus sont représentés en Figure 67 pour *dif*1 et *dif*2. Dans l'ensemble, FtsK contrôle la recombinaison (Figure 67, - FtsK), toutefois on dénote une faible fréquence de recombinaison de 1% à *dif*1 qui est indépendante de FtsK. Ce phénomène de recombinaison FtsK-indépendante résiduelle à *dif*1 est également observé sur plasmide à faible nombre de copie (Val et al., submitted) et a été attribué à une aptitude des recombinases XerCD de *V. cholerae* à former une synapse à *dif*1 où XerD serait active pour catalyser le premier échange de brin. Lorsque l'on introduit FtsK, les fréquences de recombinaison obtenues à *dif*1 et *dif*2 sont de 10% et 4,5% respectivement (Figure 67, + FtsK). Ces fréquences sont notablement plus élevées que les fréquences de formation de dimères déterminés pour les deux chromosomes en compétition de croissance qui sont de 6% pour le chromosome I et 3% pour le chromosome II (Val et al., submitted). Lorsque l'on inactive RecA, la fréquence de recombinaison à *dif*1 et *dif*2 est toujours très élevée, ce qui est surprenant vu l'absence de formation de dimères (Figure 67, + FtsK Δ*rec*A). Pour expliquer ce résultat, j'ai premièrement accusé une dérégulation du système. En effet une surexpression de FtsK entraine l'excision dérégulée de la cassette indépendamment de la formation de dimères car FtsK peut se retrouver sous forme active dans le cytoplasme (Perals et al., 2001, Barre et al., 2000). Bien que le vecteur codant pour FtsK soit à faible nombre de copies, le facteur 5-6 de surexpression de FtsK (nombre de copie par cellule du pSC101) par rapport à l'état sauvage est peut-être suffisant pour déréguler l'excision de la cassette. Pour le vérifier j'ai réalisé la même expérience dans un mutant *xer*C puisque la surexpression des recombinases XerC/D ne dérégule pas l'excision de la cassette (Perals et al., 2001) et j'ai obtenu le même



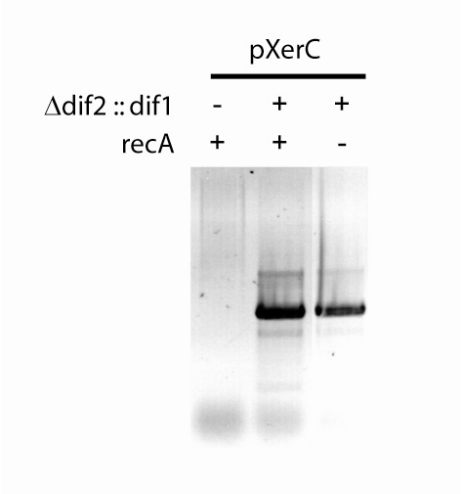


Figure 68. La recombinaison Xer entre le grand et le petit chromosome est indépendante de la formation des dimères de chromosome.
En haut, le schéma représente la réaction de recombinaison entre les deux chromosomes d'une souche ayant deux sites *dif* identiques. Le grand chromosome et le petit chromosome sont indiqués par leur numéro I et II. Les origines de réplication sont représentées par ○ et les sites *dif* par ►. Les amorces PCR utilisées pour identifier la formation de chromosomes hybrides sont représentées par des demi-flèches. En bas, les produits de PCR sont migrés sur gel d'agarose et colorés au bromure d'éthidium. Il n'y pas de produit PCR dans la souche ayant deux sites *dif* différents, *dif*1 et *dif*2, car la recombinaison n'est pas permise (Val et al., submitted). La formation de chromosomes hybrides est possible dans la souche ayant deux sites *dif* identiques, en contexte *recA*+ et *recA*-.

résultat. En effet, j'ai observé un fort taux d'excision de la cassette dans un mutant *xer*C *rec*A, en restaurant XerC par conjugaison d'un plasmide dérivé de pSC101 exprimant XerC sous son promoteur naturel (résultats non montrés). Nos résultats signifient donc que chez *V. cholerae*, la formation de dimères n'est pas un facteur indispensable à l'excision de la cassette, puisque FtsK peut avoir accès à des formes monomériques des chromosomes pour activer la recombinaison Xer. Ces formes monomériques pourraient être soit des chromosomes libres soit des chromosomes homologues intercaténés résultant de la réplication, dont la formation est indépendante de la recombinaison homologue. Grâce à cet outil génétique, nous suggérons que chez *V. cholerae* des monomères de chromosomes se retrouvent au travers du septum lors de la division permettant à FtsK d'y avoir accès.

Co-localisation de la région *dif* des deux chromosomes au septum indépendamment de la formation de dimères de chromosomes.

Lorsque l'on échange le site *dif*2 du chromosome II par un site *dif*1, il devient possible de recombiner les deux chromosomes par Xer. Nous avons montré que la recombinaison entre les deux chromosomes est spatialement possible et peut conduire à la formation transitoire d'un unique chromosome hybride visible par PCR (Figure 68) (Val et al., submitted). Nous avons émis l'hypothèse que si des formes monomériques peuvent être présentes au septum lors de l'activation de FtsK, alors la recombinaison inter-chromosomique peut être indépendante de la résolution des dimères de chromosomes. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons inactivé RecA. Les résultats présentés en Figure 68 démontrent que la recombinaison Xer entre le grand et le petit chromosome est indépendante de la formation de dimères.

Ceci suggère que *dif*1 et *dif*2 peuvent co-localiser au septum même en l'absence de dimères de chromosome.

DISCUSSION

FtsK a un rôle général dans la ségrégation des chromosomes de *V. cholerae*

Chez *E. coli*, le défaut de viabilité est le même entre un mutant *xer*C et un mutant *fts*Kc-, ce qui mène à penser que le rôle de FtsK dans la ségrégation des chromosomes est limité à la résolution des dimères de chromosomes. Chez *V. cholerae*, nous avons mis en évidence un rôle de FtsKc dans une autre fonction que celle de la résolution des dimères de chromosomes. En effet, la délétion du domaine FtsKc entraine un défaut de croissance plus élevé qu'une délétion de *xer*C. Le phénotype associé à la mutation *fts*Kc- ressemble fortement à celui d'un mutant par-, avec un grand nombre de nucléoïdes piégés dans le septum de division et un fort taux de cellules anucléées. Ces observations ne suffisaient toutefois pas à exempter FtsKc d'un rôle possible dans la division cellulaire. En effet, des mutants de la division cellulaire tels que minCD montrent un grand nombre de minicellules anucléées (Yu et al., 1998) et un mutant *fts*Z(ts) présente de long filaments dont certains présente un défaut de ségrégation dû au défaut de recrutement de FtsK au septum (Recchia et al., 1999). Un indicateur de problèmes de ségrégation chromosomique est l'induction de la réponse SOS à cause des dommages faits à l'ADN lors de la division cellulaire. Chez le mutant *fts*Kc-, le taux de cellules induisant le SOS est anormalement élevé. Nous avons donc suspecté un problème de ségrégation chez le mutant *fts*Kc-. Mais ce n'est qu'en observant une suppression totale du phénotype délétère de la mutation *fts*Kc- par l'inactivation de RecA que

nous avons pu affirmer que la différence de fitness entre un mutant *fts*Kc- et *xer*C est le résultat d'un problème de ségrégation et non de division cellulaire. Nous avons donc mis en évidence un rôle général de FtsKc dans la ségrégation des chromosomes et qui ne nécessite pas de contextes génétiques particuliers pour être apparent. Si l'inactivation de RecA permet de restaurer la viabilité des mutants *fts*Kc-, la viabilité de ces mutants n'est pas restaurée par la mutation *lex*A^{ind-}. L'autre rôle de FtsK dans la ségrégation des chromosomes semble donc également lié à l'activité de recombinaison homologue de RecA.

La fonction de translocation de FtsK est importante dans la ségrégation des chromosomes

Nos résultats montrent que les domaines α et β ainsi que l'activité ATPase de FtsKc sont nécessaires pour assurer la nouvelle fonction de FtsK chez *V. cholerae*. Chez *E. coli*, les domaines α et β constituent le moteur de FtsK qui est nécessaire à la mobilisation de l'ADN. Nous suspectons donc que la nouvelle fonction de FtsK chez *V. cholerae* est liée à son activité de translocation de l'ADN. Le taux de cellules induisant le SOS est visiblement plus élevé dans le mutant *fts*Kc- que dans le mutant *fts*Kγ- ce qui revient à dire qu'en absence de translocation de l'ADN par les domaines α et β de FtsK, les dommages faits à l'ADN sont plus nombreux. Ce résultat va dans le sens où les chromosomes ont besoin de FtsK pour être ségrégés et ne pas se retrouver guillotinés au septum. Il apparait fréquemment qu'après division une seule cellule fille *fts*Kc- semble rencontrer des problèmes, tandis que l'autre continue de se diviser normalement. Cette observation suggère qu'un seul nucléoïde se retrouve piégé au septum, permettant à une des deux cellules filles d'hériter d'un patrimoine génétique complet et par conséquent de survivre. Cette idée est soutenue par le fait

que nous observons fréquemment une asymétrie de guillotinage du nucléoïde dans le mutant *fts*Kc- alors que le guillotinage des dimères de chromosome se fait généralement au centre du nucléoïde (Cook & Rothfield, 1999, Hendricks et al., 2000, Niki et al., 1991).

La lecture polarisée du chromosome n'est pas nécessaire pour assurer la nouvelle fonction de FtsK dans la ségrégation des chromosomes

Le domaine γ de FtsK est responsable de l'activation de la recombinaison Xer et de la reconnaissance des KOPS. Nous avons vu néanmoins que seuls les domaines α et β de FtsK sont impliqués dans la nouvelle fonction de ségrégation des chromosomes. Ceci va à l'encontre de données récentes obtenus avec SpoIIIE quant à la nécessité de la lecture polarisée du chromosome pour permettre l'empaquetage du chromosome dans la pré-spore (Ptacin *et al.*, 2008). Si FtsK est nécessaire à la ségrégation des chromosomes au moment de la division cellulaire, la plupart des chromosomes sont déjà partitionnés dans chacune des cellules filles. FtsK permettrait donc de finir le travail de partition au niveau des régions de terminaison de réplication des chromosomes. Par ailleurs, la lecture polarisée des KOPS n'est peut-être pas entièrement requise pour la résolution des dimères de chromosomes (D. Sherratt, communication personnelle). Tandis que lors de la sporulation du fait de l'asymétrie du septum de sporulation, SpoIIIE doit exporter 70% du chromosome. Il apparait donc évident que la lecture orientée des chromosomes soit quelque chose d'important dans la sporulation et de facultatif dans la ségrégation des chromosomes en croissance végétative. Par ailleurs, d'autres mécanismes alternatifs impliqués dans la ségrégation des chromosomes tels que les systèmes ParAB des deux chromosomes peuvent biaiser la nécessité d'une translocation orientée de l'ADN

pour la compartimentalisation. Afin de vérifier nos hypothèses quant à la nécessité de FtsKc dans la partition des chromosomes, il serait intéressant d'observer les problèmes de ségrégation dans des doubles mutants *par*AB1 *fts*Kγ- et *par*AB1 *fts*Kc-. En effet, le système ParAB1 est requis pour la localisation polaire et la ségrégation asymétrique du grand chromosome mais les mutants *par*A1 ne présentent ni de défauts de croissance ni de défauts de partition. Dans ce contexte, l'absence de lecture polarisée des KOPS pourrait avoir un effet délétère marqué et la double mutation *fts*Kc- *par*A1 pourrait éventuellement être létale.

FtsK peut transloquer sur des chromosomes monomériques

Chez *E. coli*, la fréquence d'excision de cassettes chromosomiques encadrées par deux sites *dif* en tandem est fortement dépendante de la formation de dimères de chromosomes et par conséquent de la recombinaison homologue. Cette particularité a permis d'utiliser cet outil pour déterminer directement la fréquence de formation de dimères de chromosomes. De plus, les résultats obtenus avec cet essai suggèrent que la localisation de la région *dif* est différente selon la forme monomérique (*recA*-) et dimérique (*recA*+) des chromosomes, dans un cas FtsK n'a pas accès aux sites *dif* pour activer la recombinaison, dans l'autre cas, le dimère passe au travers du septum permettant l'accès de FtsK pour activer la recombinaison (Kennedy et al., 2008, Perals et al., 2001). Ces résultats montrent également que la plupart des caténats sont résolus par TopoIV avant activation de la recombinaison Xer par FtsK lors de la fermeture du septum. Chez *V. cholerae*, en utilisant cet essai d'excision de cassette chromosomique, nous avons mis en évidence que FtsK n'active pas seulement la recombinaison à *dif* sur des dimères (*recA*+) mais également sur des formes monomériques (*recA*-). Ces résultats nous laissent envisager que l'ADN des

chromosomes monomériques peut être accessible à FtsK pour se charger sur l'ADN lors de la fermeture du septum. FtsK peut alors pomper l'ADN jusqu'à rencontrer la cassette et activer la recombinaison Xer. Ces formes monomériques accessibles par FtsK peuvent être soit des formes intercaténées soit des formes libres mais présentant une ségrégation très tardive du terminus de réplication qui pourrait être liée à la dynamique de ségrégation des chromosomes.

Chez *E. coli*, il a été suggéré qu'après résolution des dimères en monomères, la ségrégation des chromosomes doit se faire immédiatement pour empêcher la réaction inverse. FtsK pourrait aider à débarrasser les produits de résolution du plan de division cellulaire (Sawitzke & Austin, 2001). Chez *V. cholerae*, la formation de dimères à partir de monomères est envisageable puisque FtsK est capable d'accéder aux formes monomériques, il faudra donc que cette formation dimérique soit transitoire et résolue avant division cellulaire.

FtsKc ne semble pas essentielle dans la fonction de séparation des caténats réplicatifs

Les produits provenant de la réplication de molécules d'ADN circulaires sont intercaténés du fait de la structure en hélice de l'ADN (voir introduction). La TopoIV est principalement responsable de la décaténation de l'ADN, notamment en fin de réplication (Hiasa & Marians, 1996). Chez *E. coli*, FtsK peut aider à la décaténation des chromosomes dépendant de TopoIV, mais son rôle n'est pas primordial. Chez *V. cholerae*, un rôle plus important de FtsKc dans la décaténation pouvait être envisageable. En effet chez *C. crescentus*, FtsKc a un rôle essentiel dans le recrutement de la sous-unité ParC de TopoIV au réplisome (Wang et al., 2006). Cependant, nos données ne vont pas dans ce sens, puisque le phénotype délétère

de *fts*Kc- est totalement annulé par l'inactivation de RecA. Il a été montré chez *E. coli* que l'inactivation de RecA ne supprime pas l'effet délétère du mutant parE10(ts) de TopoIV (Grompone *et al.*, 2004), ce qui s'accorde avec le fait que les caténats résultent de la réplication et non de la recombinaison homologue. Il parait donc que le défaut de ségrégation du mutant *fts*Kc- dans la ségrégation ne soit pas lié à la fonction de décaténation de caténats réplicatifs.

L'activité de translocation de FtsK est liée à l'activité de recombinaison homologue de RecA

Nous avons vu que le phénotype délétère d'un mutant *fts*Kc- est supprimé par l'inactivation de RecA. Les cellules semblent donc nécessiter FtsKc pour une ségrégation normale des chromosomes dans un contexte où RecA est actif. Nous avons vu que c'est l'activité de recombinaison homologue de RecA qui serait liée au phénotype délétère d'une mutation *fts*Kc- et par ailleurs c'est le moteur de FtsKc qui remplirait le nouveau rôle inconnu. Les raisons pour lesquelles FtsKc est primordiale dans un contexte RecA sauvage restent encore à être élucidées.

Chez *V. cholerae*, FtsK pourrait avoir un rôle plus important dans la ségrégation des chromosomes que chez *E. coli*, puisque nous avons vu qu'elle peut transloquer sur des formes monomériques (libres ou caténats réplicatifs).

L'augmentation d'évènements de recombinaison homologue pourrait conduire à la formation de plus de dimères de chromosomes. D'autre part, lors d'évènement de recombinaison homologue entre chromatides sœurs, on peut envisager que des caténats hétérologues soient formés entre le grand et le petit chromosome s'ils sont suffisamment proches dans la cellule. Dans les deux cas, la formation de dimères de chromosomes homologues et la formation de caténats hétérologues dépendraient de

la recombinaison homologue. Les données de co-localisation des termini de réplication de deux chromosomes montrent que dans 50% des cas, les deux termini co-localisent dans la cellule (Srivastava et al., 2006). Nous avons confirmé génétiquement que les régions *dif*1 et *dif*2 des deux chromosomes peuvent co-localiser au septum de division et ceci même en l'absence de formation de dimères (*recA*-), conduisant ainsi à la formation de chromosomes hybrides si les deux sites *dif* sont identiques. On peut imaginer qu'en l'absence de FtsKc, les chromosomes auraient plus de chance de recombiner avec leur homologue et par conséquent de s'entremêler aussi avec les autres chromosomes hétérologues qui sont à proximité.

Si un grand chromosome et un petit chromosome destinés à être ségrégés dans deux cellules filles différentes sont enchainés, alors il va y avoir un problème de partition des chromosomes qui sera lié à RecA. La fermeture du septum sur cette structure intercaténée entre chromosome hétérologue ne devrait être létale que pour une seule cellule fille, puisque pour libérer deux chromosomes intercaténés, seule la coupure d'un chromosome est nécessaire. Ceci pourrait être cohérent avec l'observation de nombreux filaments uniques suggérant qu'une seule cellule fille meurt.

MATERIEL ET METHODES

Souches et plasmides utilisés

Les souches de *V. cholerae* utilisées dans cette études sont dérivées de la souche El Tor N16961 séquencée (Heidelberg et al., 2000). Les mutations ont été faites par remplacement allélique en utilisant des vecteurs dérivés du vecteur pDS132 portant une origine de réplication conditionnelle R6Kγ (Philippe *et al.*, 2004) et en utilisant une stratégie précédemment décrite (Srivastava et al., 2006). Pour la construction des plasmides dans *E. coli*, les souches π1, MV21 et MV22 (pir+) ont été utilisées en tant qu'hôte. Pour le transfert conjugatif des plasmides vers les souches de *V. cholerae*, les souches *E. coli* β2163, β3914 et MV23 ont été utilisées en tant que donneuse (Demarre et al., 2005). Les mutations des régions d'intérêt ont été confirmées par PCR.

La souche d'*E. coli* utilisée pour les essais *in vivo* de recombinaison sur plasmide est dérivée de AB1157 recF, *xer*C::Gm^r, *xer*D::Km^r. Les gènes XerC et XerD ont été introduit à la place de l'allèle *xer*C::Gm^r en utilisant des vecteurs dérivés du plasmide pKO3 (Link *et al.*, 1997). Les souches ont ensuite été rendu *fts*Kc- par transduction P1 de l'allèle *fts*K1, *fts*K::Cm^r qui permet l'expression d'une forme tronquée de la protéine contenant le domaine amino-terminal essential et les deux tiers du domaine linker (Diez *et al.*, 1997).

Souches

Nom	Génotype relevant	Références
E. coli		
AB1157	*E. coli* K12	(Bachmann, 1972)
DS941	AB1157 *rec*F*143 lac*I^q *lac*ZM15	(Summers & Sherratt, 1988)
DS981	DS941 Δ*xer*C::*Km*^{r}	(Colloms et al., 1990)

Nom	Génotype relevant	Références
DS9038	DS941 Δ*xer*C::*Gm*^{r}	(Yates et al., 2003)
Π1	DH5α Δ*thy*A::(*erm*^{r}*-pir116*)	(Demarre et al., 2005)
MV21	DS981 Δ*thy*A::(*Erm*^{r}*-pir116*)	cette étude
MV22	DS9038 Δ*thy*A::(*Erm*^{r}*-pir116*)	cette étude
β2163	(F−) RP4-2-Tc::Mu Δ*dap*A::(*Erm*^{r}*-pir*)	(Demarre et al., 2005)
MV23	β2163 Δ*xer*C	cette étude
β3914	β163 gyrA462 zei-298::Tn10	(Le Roux *et al.*, 2007)
FX223	DS941 Δ*xer*D^{Ec}*::Km*^{r} Δ*xer*C^{Ec}*::Gm*^{r}	(Yates et al., 2003)
FX227	FX223 Δ*xer*C^{Ec}*::*(*xer*C^{Ec}- *xer*D^{Ec}) , Δ*fts*K$_{C}$::*Cm*^{r}	(Val et al., submitted)
V.cholerae		
CVC300	N16961 Str^{r} P$_{CP18}$ (*ara*E-*Km*^{r})	(Srivastava et al., 2006)
CVC301	N16961 Str^{r} P$_{CP18}$ *ara*E	(Srivastava et al., 2006)
MV25	CVC301 Δ*xer*C::*Sp*^{r}	(Val et al., submitted)
MV28	CVC301 Δ*fts*Kc::*Sp*^{r}	Cette étude
MV46	CVC301 Δ*fts*Kγ::*Sp*^{r}	Cette étude
MV47	CVC301 Δ*fts*Kc::(*fts*Kc-*Sp*^{r})	Cette étude
MV26	CVC301 Δ*rec*A::*Km*^{r}	(Val et al., submitted)
MV43	CVC301 Δ*xer*C::*Sp*^{r}, Δ*rec*A	(Val et al., submitted)
MV42	CVC301 Δ*fts*Kc::*Sp*^{r}, Δ*rec*A	Cette étude
MV53	CVC300 *lexA*$^{ind-}$	Cette étude
MV54	CVC301 Δ*xer*C::*Sp*^{r}, *lexA*$^{ind-}$	Cette étude
MV62	CVC301 Δ*fts*Kc:: *Sp*^{r}, *lexA*$^{ind-}$	Cette étude
MV57	CVC301 Δ*xer*C::*Sp*^{r}, Δ*lac*Z	(Val et al., submitted)
MV61	CVC301 Δ*xer*C::*Sp*^{r}, Δ*lac*Z, Δ*dif*2::*lac*Z::*dif*1	(Val et al., submitted)
MV64	CVC301 Δ*xer*C:: *Sp*^{r}, Δ*lac*Z, Δ*dif*2::*lac*Z::*dif*1, Δ*rec*A	Cette étude
MV58	CVC301 Δ*fts*Kc::*Sp*^{r}, Δ*dif*1::*dif*1-*cat*-*dif*1	Cette étude
MV69	CVC301 Δ*fts*Kc::*Sp*^{r}, Δ*dif*1::*dif*1-*cat*-*dif*1, Δ*rec*A	Cette étude
MV40	CVC301 Δ*fts*Kc::*Sp*^{r}, Δ*dif*2::*dif*2-*aph*-*dif*2	Cette étude
MV70	CVC301 Δ*fts*Kc::*Sp*^{r}, Δ*dif*2:: *dif*2-*aph*-*dif*2, Δ*rec*A	Cette étude

Nom	Génotype relevant	Références
MV49	CVC301 Δ*fts*Kc::(*fts*Kc-*Sp*^{r}) P_{IntI1} (*gfp*)	Cette étude
MV51	CVC301 Δ*xer*C::*Sp*^{r} P_{IntI1} (*gfp*)	Cette étude
MV50	CVC301 Δ*fts*Kγ::*Sp*^{r} P_{IntI1} (*gfp*)	Cette étude
MV52	CVC301 Δ*fts*Kc::*Sp*^{r} P_{IntI1} (*gfp*)	Cette étude

Plasmides

pDS132	*ori*$V_{R6K\gamma}$, *mob*$_{RP4}$, with *sac*B for allele exchange	(Philippe et al., 2004)
pMEV68	pDS132 derivative for Δ*rec*A	(Val et al., submitted)
pMEV97	pDS132 derivative for Δ*rec*A::*Km*^{r}	(Val et al., submitted)
pMEV69	pDS132 derivative for Δ*lac*Z	(Val et al., submitted)
pMEV72	pDS132 derivative for Δ*xer*C::*Sp*^{r}	(Val et al., submitted)
pMEV73	pDS132 derivative for Δ*ftsKc*::*Sp*^{r}	Cette étude
pMEV130	pDS132 derivative for Δ*ftsKγ*::*Sp*^{r}	Cette étude
pMEV131	pDS132 derivative for Δ*fts*Kc::(*fts*Kc-*Sp*^{r})	Cette étude
pSW4426T	*ori*$V_{R6K\gamma}$, *ori*T_{RP4}, with *aad*A7-*ara*C-P_{BAD}*ccd*B	(Le Roux et al., 2007)
pLexAind-	pSW4426T:: *lexA*ind - KO vector	G. Cambray (non publié)
pSW29T	*ori*$V_{R6K\gamma}$, *ori*T_{RP4}	(Demarre et al., 2005)
pInt1 ::GFP	pSW29T:: P_{IntI1} (*gfp*)	G. Cambray (non publié)
pMEV100	pDS132 derivative for Δ*dif*1::*dif*1-*cat*-*dif*1	Cette étude
pMEV114	pDS132 derivative for Δ*dif*2::*dif*2-*aph*-*dif*2	Cette étude
pMEV184	pDS132 derivative for Δ*dif*2 ::*lac*Z ::*dif*1	(Val et al., submitted)
pMEV43	pSC101:: (*dif*-*Cm*^{r}-*dif*)	(Val et al., submitted)
pFX380	pBAD :: *fts*K^{Vc} under P_{ara} promoter	(Val et al., submitted)
pMEV204	pBAD :: *fts*K$^{Vc}_{ATP-}$ under P_{ara} promoter	Cette étude
pMEV205	pBAD :: *fts*K$^{Vc}_{\gamma-}$ under P_{ara} promoter	Cette étude
pMEV145	pSC101, *ori*TRP4 expressing *fts*K^{Vc}	Cette étude
pMEV188	pSC101, *ori*TRP4 expressing *fts*K $^{Vc}_{ATP-}$	(Val et al., submitted)
pMEV190	pSC101, *ori*TRP4 expressing *fts*K$^{Vc}_{\gamma-}$	(Val et al., submitted)
pMEV146	pSC101, *ori*TRP4 expressing *xer*C^{Vc}	(Val et al., submitted)

Conjugaisons et remplacements allèliques dans *V. cholerae*

Les cellules donneuses contenant le plasmide à conjuguer sont mis en culture jusqu'à DO 0,3. Les cellules receveuse de *V. cholerae* (pir-) sont mis en culture jusqu'à DO 0,4. Les souches donneuses et receveuse sont alors mélangées à un ratio 1:10 (donneuse : receveuse) dans un volume final de 5mL et concentrées sur filtre (0,2µM). Le filtre est déposé sur milieu LB-agar supplémenté de DAP (acide diaminopimélique à 3mM) et incubé à 37ºC. Les bactéries sont ensuite suspendues dans 5 mL de LB. Des dilutions en série de la suspension sont étalées sur milieu LB-agar dépourvu de DAP (les donneuses sont auxotrophes pour le DAP) et supplémenté de l'antibiotique sélectionnant pour le plasmide. Pour les plasmides réplicatifs dans la souche receveuse, une incubation d'une heure du filtre à 37ºC permet d'obtenir 10^6 conjuguants / mL. Pour les plasmides suicides intégratifs, une incubation de 16 heures à 37ºC permet d'obtenir selon le locus d'intégration, entre 10^2 et 10^4 intégrants / mL. Dans le cas des plasmides dérivés de pDS132, possédant le gène de contre-sélection *sac*B, les évènements d'excision sont sélectionnés sur LB-agar (15% sucrose) à 25ºC. Dans le cas des plasmides de type pSW4426T, possédant le gène *ccd*B sous le promoteur P_{ara}, les évènements d'excision sont sélectionnés sur LB-agar (0,2% arabinose) à 37ºC.

Microscopie

- <u>Observation des nucléoïdes après condensation au chloramphénicol</u>

Le chloramphénicol a été parfois utilisé pour améliorer la visualisation de la partition des nucléoïdes chez *E. coli* (Begg & Donachie, 1991, Recchia et al., 1999, Steiner & Kuempel, 1998a). Le nucléoïde est normalement étendu en forme de lobe par les processus de traduction et translocation co-transcriptionnelle des protéines

membranaires (translésion). Comme le chloramphénicol provoque le désassemblage des complexes traductionnels, le nucléoïde s'arrondit (Zusman *et al.*, 1973). L'incubation des cellules avec du chloramphénicol entraine la condensation des nucléoïdes et les connexions entre les nucléoïdes sont plus facilement observées (Steiner & Kuempel, 1998a). Afin de mettre en évidence d'éventuels problèmes de ségrégation chez *V. cholerae*, il nous a été nécessaire de condenser les nucléoïdes puisque ceux-ci sont étendus sur toute la longueur de la cellule (Figure 69 a,b). L'observation après traitement au chloramphénicol est alors facilitée car le DAPI se trouve concentré en un unique spot (Figure 69 c). Bien que le chloramphénicol puisse générer quelques artéfacts quant au positionnement des nucléoïdes, aucuns défauts de partition n'ont été observés pour la souche sauvage traitée dans les mêmes conditions.

Les cellules sont cultivés en milieu M9 (0,4% glucose) jusqu'à DO 0,6 puis traitées au chloramphénicol (20 µg/mL) pendant 3 heures. Les cellules sont alors simultanément fixées dans une solution de 5% de paraformaldéhyde / 0,06% glutaraldéhyde / 1X PBS et colorées au DAPI (2 µg/mL) pendant 20 minutes à 4ºC sur roue agitante. Les cellules sont alors lavées deux fois au PBS (1X) et peuvent être gardées à 4ºC pendant plusieurs mois. Les cellules sont déposées sur une lame recouverte d'une fine couche d'agarose (1% agarose - 1X PBS) et observées au microscope à fluorescence (DM6000-B Leica couplé à une caméra Coolsnap HQ CCD de Photometrics). Le programme 'ImageJ' a été utilisé pour analyser les images.

- <u>Test de viabilité (LIVE and DEAD)</u>

Le kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability (Molecular Probe ref. L13152) est composé de deux colorants. Les bactéries ayant des membranes cellulaires intactes

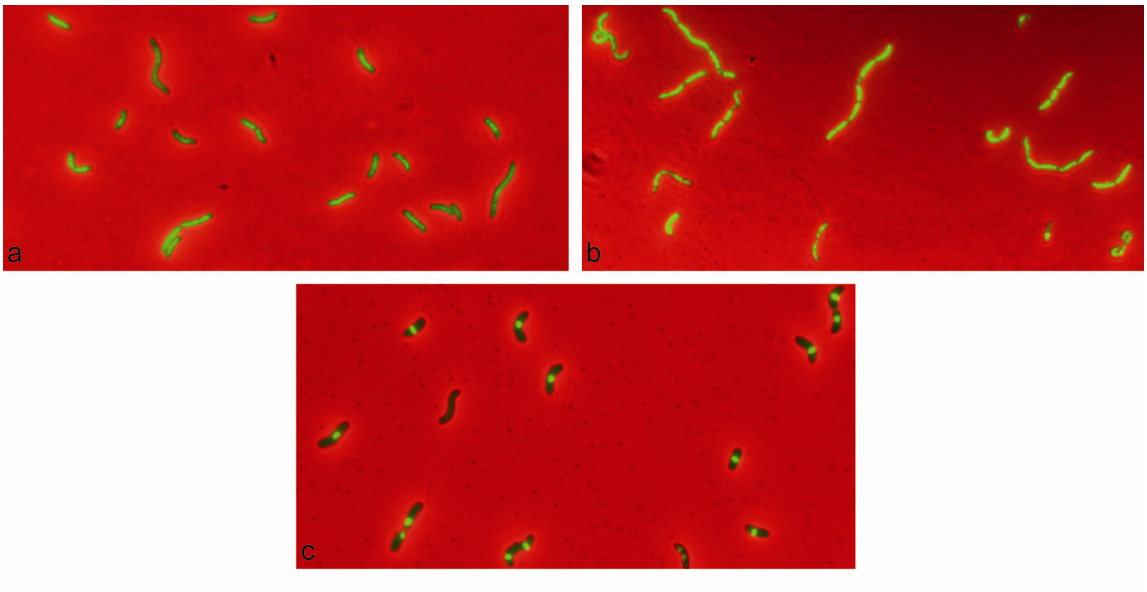


Figure 69. Condensation des nucléoïdes de *V. cholerae* au chloramphénicol pour observer les problèmes de partition.
Observation au microscope à contraste de phase et à fluorescence (objectif x100) de cellules non traitées au chloramphénicol avant coloration au DAPI (a) et (b) et de cellules traitées 3 heures au chloramphénicol (20 µg/mL) avant coloration au DAPI (c).

vont être colorées en vert par le SYTO 9, tandis que les bactéries avec des membranes endommagées vont être colorées en rouge par l'Iodure de propidium. Les maxima d'excitation/émission sont de 480/500 nm pour le Syto9 et 490/635 pour l'iodure de propidium. Les cellules sont cultivées en LB jusqu'à DO 0,6 avant coloration.

- Formation de microcolonies

La procédure expérimentale utilisée est la même que (Hendricks et al., 2000). Les cellules sont cultivées en LB jusqu'à DO 0,6 puis déposées sur lame recouverte d'une fine couche de LB-agar. Les lames sont soit observées immédiatement à différent intervalles de temps (timelapse), soit incubées 2 heures à 37ºC en chambre humide (taux de cellules non viables) après vérification sous le microscope d'une correcte dispersion des cellules. Le calcul de la fraction de cellules non viables au sein d'une population est le nombre de cellules uniques divisé par la somme du nombre de cellules unique et des microcolonies formées après incubation.

Essai de compétition de croissance

La procédure expérimentale est expliquée dans (Val et al., submitted). Sommairement, les essais de co-culture de *Vibrio cholerae* ont été adaptés des essais de co-culture d'*E. coli* afin de compenser pour leur rapidité de croissance (Perals et al., 2000). Les cultures sont faites à 30ºC sous une agitation de 180 rpm et diluée toutes les 12 heures d'un facteur de 10 000. La fréquence relative des souches mutantes et sauvages est déterminée par étalement sur milieu sélectifs (kanamycine et spectinomycine). Selon le défaut de croissance du mutant, l'étalement est réalisé toutes les 13-14 générations (12 heures) ou toutes les 26-28 générations (24 heures).

Essai de recombinaison *in vivo* sur plasmide

La procédure expérimentale est décrite dans (Val et al., submitted)

Mesure du taux de recombinaison Xer sur chromosome

La mesure directe de la fréquence de recombinaison Xer à *dif* sur le chromosome est effectuée dans des souches ayant deux sites *dif* en répétition directe flanquant une cassette de résistance à un antibiotique inséré au locus de *dif* (Perals et al., 2000). L'action du système Xer / FtsK sur les deux sites *dif* génère l'excision de la cassette donnant lieu à des cellules présentant un phénotype sensible pour l'antibiotique.

Les souches portant les cassettes d'excision sont dépourvues de l'activité de XerC ou de FtsKc. Un plasmide dérivé de pSC101 codant pour XerC (pMEV146) ou FtsK (pMEV145) sous leur promoteur naturel est contenu dans une souche donneuse β2163.

Jour 0 - La conjugaison du plasmide d'expression pMEV145 ou pMEV146 dans les souches portant les cassettes d'excision est fait selon la procédure expliquée précédemment. Les cellules donneuses et receveuses sont laissées en contact sur le filtre pendant une heure à 37ºC sur LB-agar supplémenté de DAP (les cellules donneuses étant auxotrophe pour le DAP). Après la période d'incubation, les cellules sont resuspendues et diluées au 1/100 en milieu LB liquide sans DAP supplémenté d'antibiotique pour sélectionner uniquement les cellules receveuses ayant le plasmide d'expression (milieu sélectif des cellules conjugantes). Les cellules sont alors incubées à 30ºC sous agitation (180 rpm).

La suspension bactérienne initiale est étalée sur milieu LB-agar sélectif des cellules conjugantes afin de déterminer le nombre initial de conjugants et le taux d'excision initial de la cassette. Puis à différents temps de l'incubation, des prélèvements sont

effectués, dilués adéquatement et étalés sur milieu LB-agar sélectif des conjugants. L'ensemble des boites sont incubées à 30ºC sur la nuit.

Jour 1 – Les colonies sont comptées afin de déterminer le nombre de génération effectués par les conjugants. Puis, au moins 100 colonies sont repiquées sur milieu sélectif contenant l'antibiotique de résistance de la cassette d'excision et sur milieu sélectif des conjugants.

Jour 2 – Le nombre de cellules ayant poussées sur le milieu sélectif contenant l'antibiotique de la cassette d'excision est rapporté au nombre total de conjugants ayant poussées sur le milieu sélectif des conjugants, ce qui correspond au 'pourcentage de cellules non excisées'. On détermine alors le pourcentage d'excision de la cassette par génération comme étant le résultat de l'équation = 1- exp (Ln (% cellules non excisées à t+1)/(% cellules non excisées à t)/ (nombre de générations en t et t+1))

Détection de formes hybrides de chromosome hétérologues

La procédure expérimentale est décrite dans (Val et al., submitted)

DISCUSSION

I. Mode d'action des recombinases XerC/D en fonction du substrat de recombinaison

Au cours de ma thèse, j'ai étudié le mode de recombinaison des recombinases XerC/D de *V. cholerae* au niveau du site *att*P de CTXφ et des sites *dif*1 et *dif*2 des deux chromosomes de *V. cholerae*. L'ensemble des résultats que j'ai obtenu illustre à quel point la nature du site des recombinases influence le mécanisme de recombinaison.

Dans un premier temps, j'ai étudié le mode d'intégration du phage CTXφ par les recombinases XerC/D au niveau du site *dif*1 de *V. cholerae* N16961. Nous avons découvert que le site permettant l'intégration du phage est atypique. La région *att*P du génome simple brin de CTXφ se replie en structure secondaire double brin pour former un substrat fonctionnel des recombinases XerC/D. Ce site atypique est formé de séquences de fixation des recombinases assez dégénérées et d'une région centrale non appariée, le brin Top étant de 12pb et le brin Bottom de 7pb.

Dans un second temps, j'ai étudié la résolution des dimères de chromosome dans la souche N16961 de *V. cholerae*. Cette souche porte deux sites *dif*1 et *dif*2 de séquences différentes. Les sites *dif*1 et *dif*2 ont été identifiés préalablement en tant que cibles d'intégration du phage CTXφ. Cependant, aucune étude de leur rôle dans la résolution des dimères de chromosomes n'avait encore été effectuée.

Les sites *dif*1 et *dif*2 présentent d'importantes différences au niveau de la région centrale, ce qui pouvait laisser penser un mode d'action des recombinases différents sur ces sites. Mes travaux montrent une coévolution du système XerC/D, FtsK, *dif*1 et *dif*2 de *V. cholerae*, qui agissent de concert pour résoudre les dimères des deux chromosomes par une voie de recombinaison commune. En effet, les recombinases XerC/D agissent à *dif*1 et *dif*2 selon la même voie catalytique qui est contrôlée par la

protéine septale FtsK. Les recombinases XerD initient la première paire d'échange de brins, conduisant à la formation d'une jonction de Holliday qui est ensuite résolue par une deuxième paire d'échange de brin catalysée par XerC.

La recombinaison entre CTX-*att*P et *dif*1, conduisant à l'intégration du phage CTXφ dans le chromosome, suit quant à elle une voie très différente de celle de résolution des dimères des chromosomes. La recombinaison Xer entre CTX-*att*P et *dif*1 est indépendante de FtsK et incomplète puisqu'une seule paire d'échange de brin est catalysée par XerC.

I.1. Les fondements communs de la recombinaison Xer à *dif*1, *dif*2 et CTX-*att*P

Malgré les différences structurales et nucléotidiques de ces trois sites, quelques caractéristiques communes dans le mécanisme de clivage des recombinases ont été observées. Le site de coupure des recombinases est toujours situé à la jonction entre la séquence de fixation des recombinases et la région centrale (XerC clivant le brin Top et XerD clivant le brin Bottom), ceci même dans le cas de CTX-*att*P où la région centrale est très atypique (McLeod & Waldor, 2004, Val et al., 2005, Val et al., submitted). *In vitro* et en l'absence de protéines accessoires, XerC est favorisée pour effectuer le premier clivage sur ces trois substrats (Val et al., 2005, Val et Barre, résultats non publiés).

I.2. Influence de la région centrale dans le mécanisme de recombinaison

I.2.1. La séquence de la région centrale

La séquence de la région centrale est connue pour influencer fortement la réaction de recombinaison. Par exemple chez Cre, la sélectivité de brin est associée aux

dinucléotides scissiles bordant la région centrale du site *lox*P, ce qui provoque une courbure asymétrique de l'ADN dans la synapse (Guo et al., 1999, Lee et al., 2003, Lee & Sadowski, 2003). De plus, le taux de purine de la région centrale influence la conformation de la jonction de Holliday et biaise son mode de résolution (Azaro & Landy, 1997, Arciszewska *et al.*, 1997). Dans la recombinaison Xer à *dif*, l'impact de la séquence de la région centrale a été très discuté. On retrouve un profil caractéristique qui différencie les sites *dif* chromosomiques des sites plasmidiques. Ce profil chromosomique consiste en une alternance purine/pyrimidine de la région centrale. Le manque de prédominance d'un brin riche en purine par rapport à l'autre brin dans les sites *dif* chromosomiques pourrait expliquer le besoin additionnel de la protéine FtsK pour orienter l'ordre d'échange des brins (Lee & Sadowski, 2005). Cependant cette alternance n'est pas générale à tous les sites *dif* chromosomiques comme chez *Haemophilus influenzae* ou *Caulobacter crescentus* (c.f. Figure 7 de (Val et al., submitted)). Mes travaux montrent que les recombinases XerC/D suivent une même voie de recombinaison à *dif*1 et *dif*2 qui est contrôlée par FtsK. Les régions centrales des sites *dif*1 et *dif*2 sont très divergentes mais possèdent tous les deux une alternance purine/pyrimidine conformément aux hypothèses précédentes.

La région centrale de *dif*1 diffère du site consensus des γ-protéobactéries par une seule base qui est adjacente au site de coupure de XerD. Cette base variante est une guanine remplaçant une adénine que l'on retrouve également à *dif*2. Cette guanine s'est révélée extrêmement importante dans le contrôle catalytique de la recombinaison Xer par FtsK à *dif*1 chez *V. cholerae*. Au site *dif* d'*E. coli* où une adénine remplace la guanine du site *dif*1, les recombinases de *V. cholerae* peuvent

recombiner indépendamment de FtsK tout en conservant le même ordre d'échange de brin.

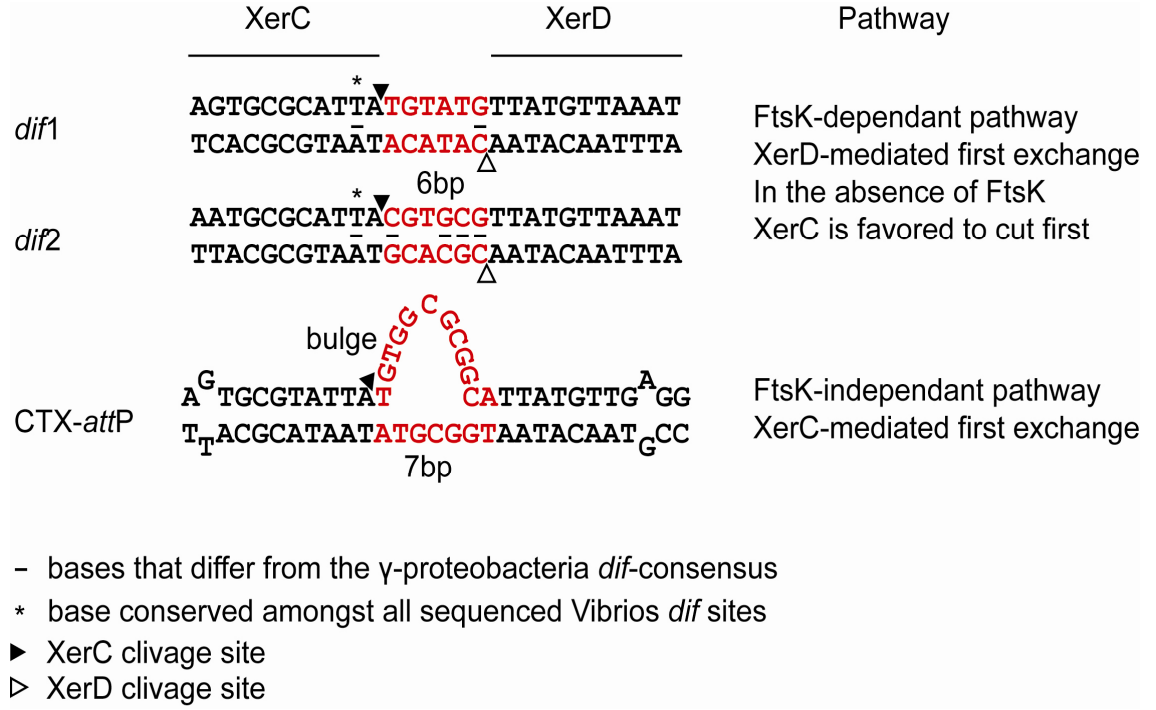


Figure 70. Séquences des trois sites de recombinaison de recombinaison XerC/D de V. cholerae (*dif*1, *dif*2 et CTX-*att*P).
Le site de fixation des recombinases XerC et XerD est indiqué au-dessus. Les sites de coupures sont indiqués par des triangles.

I.2.2. Cas particulier de CTX-*att*P : une région centrale non appariée

La recombinaison à CTX-*att*P suit une voie différente de *dif*1/*dif*2. La recombinaison à CTX-*att*P est incomplète, seule XerC catalyse une paire d'échange de brin. La présence d'une bulle de mésappariement pourrait favoriser le clivage par XerC, surtout que l'absence d'homologie 'intra-brins' dans la région centrale défavorise la réaction inverse de religation (Figure 70). En effet, lors de la ligation, une courte séquence d'homologie permet de stabiliser les deux brins d'ADN à liguer. L'absence d'homologie dans la région centrale entre le brin Top et Bottom empêche donc la réaction inverse de religation.

La bulle de mésappariement et l'hétérogénéité des tailles Top et Bottom semble être un élément important du site *att*P. En effet, on a observé une co-évolution des mutations entre les sites de fixation des recombinases afin de former une structure secondaire stable. Par contre, les régions centrales des sites demeurent très divergentes ce qui procure certainement un avantage évolutif au phage. Une région non appariée analogue à celle du site CTX-*att*P est retrouvée dans les sites *att*C des cassettes de gènes qui partagent un mécanisme d'intégration simple brin similaire à CTXφ (Bouvier *et al.*, 2005). Des études de cette région montrent que l'orientation et la forme de la région centrale ont un rôle critique sur l'efficacité de recombinaison (M. Bouvier et al., travaux en cours de publication). Il serait donc intéressant d'étudier de manière plus approfondie l'importance de la structure et des déterminants nucléotidiques de la région centrale de CTX-*att*P dans la réaction de recombinaison.

I.2.3. La taille de la région centrale

La taille de la région centrale espaçant les séquences de fixation des recombinases joue un rôle important dans l'interaction des recombinases. La taille consensus de la région centrale des sites de recombinaisons Xer est de 6 pb. Au site *cer*, la taille de la région centrale est de 8 bp. La recombinaison à *cer* nécessite absolument des facteurs accessoires pour favoriser le contact entre les recombinases (Blakely & Sherratt, 1996, Sherratt *et al.*, 1995). La recombinaison de CTX-*att*P ne nécessite pas de facteurs accessoires bien que le brin Top ait une région centrale de 12 bases (Figure 70). Le rapprochement des recombinases semble donc favorisé par la taille de la région centrale de 7 bases du brin Bottom.

I.2.4. L'homologie de séquence de la région centrale entre les deux sites partenaires

Une courte séquence d'homologie 'inter-sites' de la région centrale des sites de recombinaison est généralement importante pour effectuer l'échange de brin entre les sites partenaires (Nunes-Duby *et al.*, 1995). En effet, après clivage, la ligation des brins est stabilisée par l'appariement des séquences entre les sites partenaires (Guo *et al.*, 1997).

Nous avons observé que l'absence d'homologie entre *dif*1 et *dif*2 permet d'empêcher des événements de recombinaison entre chromosomes hétérologues. Si on remplace le site *dif*2 par le site *dif*1 sur le petit chromosome, alors on peut détecter des évènements de recombinaison à *dif* entre les deux chromosomes.

Selon la variante du phage CTXφ et selon la souche de *V. cholerae*, CTXφ est trouvé intégré uniquement au chromosome I ou uniquement au chromosome II ou alors dans les deux chromosomes. La spécificité de CTXφ à s'intégrer sélectivement au niveau de certains sites *dif* pourrait reposer sur la présence de séquences homologues entre *att*P et *dif*. Dans le cas étudié de la souche El Tor N16961 et du phage CTXφ El Tor, il y a un échange de 3 bases homologues du site *att*P du phage vers le site *dif*1 et d'une base homologue du site *dif*1 vers le site *att*P. Ces très courtes séquences d'homologie sont suffisantes pour autoriser ou interdire l'intégration du phage à un site. Par exemple CTXφ El Tor ne peut pas s'intégrer au site *dif*2 de la souche N16961 par manque d'homologie entre les deux sites de recombinaison, par contre si on remplace *dif*2 par *dif*1 alors CTXφ peut s'intégrer au niveau des deux chromosomes (Val et Barre, non publiés). Ce mécanisme diffère du cas des intégrons qui partagent pourtant un mécanisme similaire d'intégration simple brin. En effet, dans le cas des intégrons, les sites *att*I des intégrons et les sites *att*C

des cassettes de gènes ne partagent pas une région centrale identique (Bouvier *et al.*, 2005). Cependant, cette absence d'homologie ne les empêche pas de recombiner entre eux (Bouvier et al., 2005).

Le besoin d'homologie 'inter-sites' du système de recombinaison Xer sert probablement de contrôle afin d'éviter des évènements de recombinaison aléatoires entre sites non partenaires.

I.3. Les sites de fixation des recombinases XerC/D

L'affinité des recombinases pour leur site de fixation peut jouer un rôle important dans la stabilité du complexe synaptique. Un défaut de fixation des recombinases sur leur site de recombinaison entraine une déstabilisation du complexe synaptique qui peut être compensé par l'apport de séquences et de protéines accessoires (Blake *et al.*, 1997).

Les sites de fixation des recombinases sur *dif*1 et *dif*2 ne diffèrent que d'une base par rapport au consensus des γ-protéobactéries. Cette base variante est une thymine remplaçant une adénine dans le site de fixation de XerC. Cette thymine est trouvée conservée dans tous les autres sites des Vibrios *dif*1 et *dif*2 séquencés à l'heure actuelle. La thymine variante du site de fixation de XerC est également retrouvée sur le site *att*P de CTXφ. Lorsqu'on substitue cette thymine par une adénine à *dif*1 et *dif*2, on observe une perte du contrôle de la recombinaison par FtsK. Il semble donc que la séquence de fixation des recombinases puisse aussi participer à donner une conformation adéquate de la synapse de recombinaison, permettant un contrôle de l'activité des recombinases par FtsK.

La séquence des sites de fixation des recombinases de CTX-*att*P est très dégénérée au niveau des bases situées vers l'extérieur du site. Notamment le site de fixation de XerD présente 4 bases sur 11 de variantes, ce qui est surprenant du fait de la forte conservation de cette séquence entre les sites *dif* chromosomiques mais aussi les sites plasmidiques. Cependant les deux recombinases reconnaissent toujours spécifiquement leurs séquences de fixation (McLeod & Waldor, 2004). La dégénérescence des deux sites de fixation semble avoir évoluée conjointement sur les deux sites *att*P I et II de la forme réplicative, puisque seulement deux paires de bases (une dans chaque site de fixation) se retrouvent non appariées sur la structure secondaire du site simple brin CTX-*att*P. La coévolution de ces mutations permet d'assurer une structure secondaire double brin du site *att*P. Il reste cependant intriguant de voir que ces mutations n'ont pas co-évoluées vers un site canonique de recombinaison Xer. Cela suggère que soit l'évolution du site n'est pas terminée, soit la séquence dégénérée des sites de fixation des recombinases a un rôle dans le mécanisme de recombinaison.

I.4. La nécessité d'autres facteurs

Malgré la dégénérescence des sites de fixation des recombinases du site CTX-*att*P, la recombinaison entre CTX-*att*P et *dif*1 ne nécessite pas de facteurs accessoires pour effectuer le premier échange de brin. Cependant, la jonction de Holliday n'est pas résolue par XerD et fait intervenir d'autres facteurs cellulaires.

Contrairement à CTX-*att*P, la réaction de recombinaison Xer à *dif*1 et *dif*2 nécessite la présence de la protéine FtsK pour activer la recombinaison. Chez *E. coli*, il a été montré que FtsK est essentielle pour activer directement XerD afin de catalyser le premier échange de brin, cependant les mécanismes moléculaires d'activation de

XerD par FtsK sont encore largement incompris. Chez *E. coli*, la résolution de la jonction de Holliday par XerC est indépendante de FtsK. Du fait de la forte similitude entre le système de *E. coli* et le système de *V. cholerae*, il est probable que ce soit également le cas chez *V. cholerae*.

Le contrôle de la recombinaison à *dif*2 est très régulé et on n'observe pas de recombinaison en l'absence de FtsK. Par contre, on observe une fuite du contrôle à *dif*1, observable par un faible taux de recombinaison à *dif*1 en l'absence de FtsK. Nous avons également observé que les recombinases de *V. cholerae* peuvent recombiner indépendamment de FtsK au niveau du site *dif* d'*E. coli*. Cette particularité est d'autant plus importante, que c'est toujours XerD qui initie le premier échange de brin. En effet, d'autres combinaisons de substrats / recombinases avaient déjà montrés une recombinaison indépendante de FtsK mais elle était toujours initiée par XerC (Neilson et al., 1999, Recchia et al., 1999). Ceci suggère que XerD de *V. cholerae* est en configuration active à *dif* d'*E. coli* dans la conformation initiale de la synapse. Il serait donc intéressant d'utiliser cette particularité pour faire des études structurales de l'interaction dans la synapse des recombinases Xer sur les différents sites *dif*, *dif*1 et *dif*2 afin d'identifier les conformations ON (*dif*), OFF (*dif*2) et intermédiaire (*dif*1) de la recombinaison Xer tout en s'affranchissant des contraintes associés à la présence de FtsK. Par exemple, il serait envisageable de faire des études cristallographiques du complexe synaptiques des recombinases Xer de *V. cholerae* sur ces trois substrats.

II. Un nouveau mode d'intégration phagique

A travers l'étude du mode d'action des recombinases sur le site *att*P de CTXφ, nous avons mis en évidence un mode inédit d'intégration phagique. Le génome simple brin

de CTXφ peut former des structures secondaires d'ADN double brin. Parmi ces structures secondaires, on retrouve l'origine de réplication ori+ (Moyer *et al.*, 2001) et le site *att*P d'intégration du phage (McLeod & Waldor, 2004). Le site *att*P ainsi replié constitue un substrat actif des recombinases Xer qui vont pouvoir catalyser une paire d'échange de brin, conduisant à la formation d'une jonction de Holliday entre le chromosome et le génome du phage.

In vitro, nous n'avons pas observé de résolution de la jonction de Holliday par seconde paire d'échange de brin par Xer. *In vivo*, elle est cependant résolue et mène à l'intégration du prophage. Il est cependant peu probable que cette résolution fasse intervenir XerD ou d'autres résolvases de jonction de Holliday car selon le sens de résolution, elle conduirait soit à l'excision du phage soit à la linéarisation du chromosome. Dans un premier temps, cette linéarisation n'a pas lieu d'etre létale dans le cas particulier d'une intégration à *dif*1. En effet, des expériences de linéarisation du chromosome d'*E. coli* par recombinaison avec le phage linéaire N15 à proximité du site *dif* montre que la linéarisation de son chromosome n'a pas d'effet détrimentaire pour la bactérie quand elle peut résoudre les dimères causés par la réplication du chromosome linéaire par la télomérase du phage N15 au niveau des séquences télomériques *tos* (Cui et al., 2007). Le système Xer pourrait de même sauver la bactérie en ajoutant un cross-over entre deux sites placés à l'extrémité du chromosome linéaire. Cependant dans le cas de CTXφ, les sites reformés à chaque extrémité du chromosome linéaire ne seraient pas compatibles pour recombiner entre eux, ce qui devrait rendre la linéarisation du chromosome par CTXφ létale pour la cellule. Dans le cas de la recombinaison *att*C/*att*I entre les gènes de cassettes simple brin et les intégrons double brin, un modèle de résolution de la jonction de

Holliday a été émis par lequel le passage de la fourche de réplication pourrait permettre l'intégration de la cassette (Figure 71) (Bouvier et al., 2005, Mazel, 2006). Ce modèle pourrait également s'appliquer à l'intégration du phage CTXφ.

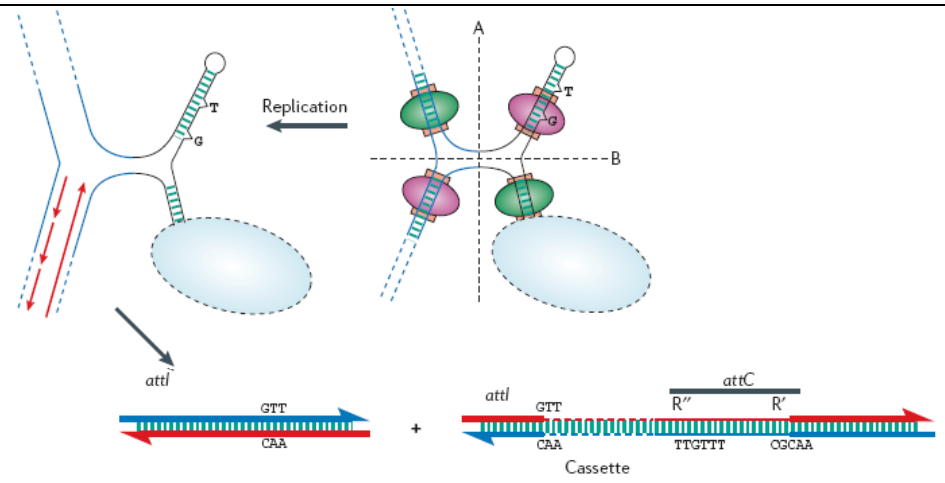


Figure 71 . Modèle de résolution de la jonction de Holliday formée entre les sites *att*C simple brin et *att*I double brin (figure adaptée de Mazel, 2006).
La résolution de la jonction de Holliday selon l'axe A reverserait la recombinaison vers les substrats initiaux, tandis que la résolution par l'axe B conduit à la formation de deux molécules linéaires covalemment fermées. Une résolution non abortive nécessite une étape de réplication indiquée par les flèches rouges. Cette étape de réplication donne lieu à deux produits de recombinaison : chromosome parental et chromosome ayant intégré la cassette. Les lignes rouges montrent les brins nouvellement synthétisés.

La jonction de Holliday formée après le premier échange de brin catalysé par XerC entre CTX-*att*P et *dif*1 est déséquilibrée du fait de la différence en taille des brins échangés. Cette caractéristique pourrait empêcher l'activation de la recombinase XerD pour effectuer le second échange de brin. Cependant, même si XerD pouvait catalyser le clivage de la seconde paire de brin, l'absence d'homologie entre les sites CTX-*att*P et *dif*1/*dif*2 à proximité du site de coupure de XerD empêcherait le second échange de brin d'avoir lieu. Il serait intéressant d'étudier ce point en introduisant une homologie de séquence au site de coupure de XerD entre les sites CTX-*att*P et *dif*1 pour voir si la jonction de Holliday serait productive pour activer XerD.

La recombinaison Xer entre les sites simple brin CTX-*att*P et double brin *dif* est donc une bonne illustration de la flexibilité d'un système de recombinaison séquentiel. En effet, un système séquentiel consent une certaine liberté tel que l'arrêt de la recombinaison à mis parcours pour utiliser un mode différent de résolution de la jonction de Holliday.

Les expériences d'intégration de CTXφ ont été réalisées chez *E. coli* en n'utilisant que le site *att*P. Il serait intéressant de poursuivre à présent l'étude du mode d'intégration du phage en recherchant les déterminants bactériens et phagiques impliqués dans l'intégration de CTXφ à *dif*. Des études montrent que le phage CTX ne peut pas se répliquer chez *E. coli* (Waldor et al., non publiés, Val et Barre, non publiés). Il sera donc nécessaire de travailler chez son hôte naturel *V. cholerae*. De plus, il serait intéressant de connaitre la balance entre réplication et intégration du phage. Pour cela, on pourrait étudier les rôles respectifs des protéines phagiques dans la production et la stabilisation d'ADN simple brin et rechercher la contribution des origines de réplications du phage dans la formation d'ADN simple brin.

III. Un système commun de maintenance d'un génome multipartite

L'étude de la recombinaison Xer à *dif*1 et *dif*2 nous a permis de montrer que la résolution des dimères de chromosomes suit une voie commune pour les deux chromosomes chez *V. cholerae*. Ce résultat est original car c'est la première évidence d'un système absolument commun de maintenance des chromosomes hétérologues chez les bactéries. En effet, chez les eucaryotes, tous les chromosomes hétérologues sont gérés pas des systèmes collectifs alors que chez les bactéries multipartites les systèmes étudiés à l'heure actuel d'initiation de la

réplication et de partition des chromosomes sont distincts pour chaque chromosome (Dubarry *et al.*, 2006, Duigou *et al.*, 2006, Egan & Waldor, 2003, Fogel & Waldor, 2006, Yamaichi *et al.*, 2007). Nous mettons en évidence que la mise en commun du système Xer nécessite cependant quelques ajustements. En effet, il apparait d'après la comparaison des sites *dif* d'organismes à multiples chromosomes que leurs régions centrales diffèrent. La conservation de cette différence au cours de l'évolution doit témoigner d'un avantage sélectif. Nous suggérons que la différence des régions centrales permet d'éviter les évènements de recombinaison Xer entre chromosomes hétérologues qui pourrait conduire à la formation de chromosomes hybrides. Le maintien de la différence des sites *dif* augmente cependant la complexité du système Xer car les recombinases doivent agir au niveau de différents sites de recombinaison tout en restant régulée par FtsK afin d'éviter des évènements aléatoires de recombinaison. Nous avons mis en évidence une co-évolution des recombinases XerC/D, de la protéine FtsK et des sites *dif*1 et *dif*2 chez *V. cholerae* afin de maintenir un système contrôlé de recombinaison.

IV. Rôle de FtsKc dans la ségrégation des deux chromosomes de *V. cholerae*

Nous avons montré que la résolution des dimères des deux chromosomes de *V. cholerae* est activée par FtsKc. De plus, les deux chromosomes sont polarisés par des séquences KOPS qui sont reconnues par FtsKγ. Ceci suggère que comme chez *E. coli* (Capiaux *et al.*, 2002), FtsKc de *V. cholerae* a un rôle de mobilisation de l'ADN sur les deux chromosomes pour rapprocher les sites *dif*1 et *dif*2 des dimères de chromosomes. FtsK est ancrée au septum précocement chez *E. coli* mais ne devient active dans la résolution des dimères de chromosomes qu'aux ultimes étapes de la fermeture du septum (Kennedy *et al.*, 2008). Si cela est également vrai chez *V.*

cholerae, FtsK doit alors synchroniser la résolution des dimères de deux chromosomes à la division cellulaire.

Par ailleurs, nous avons vu que chez *V. cholerae*, FtsK a la possibilité d'activer la recombinaison Xer sur des formes monomériques des chromosomes I et II. De plus, le rôle de FtsKc n'est pas limité à la résolution des dimères de chromosomes, même si ce rôle reste lié à l'activité de recombinaison homologue. FtsK pourrait empêcher des évènements de recombinaison homologues qui pourrait conduire à la formation de structures chromosomiques non séparables telles que des dimères ou des caténats hétérologues. Cependant des preuves expérimentales sont nécessaires pour venir appuyer ce modèle. Des expériences de biologie cellulaire en temps réel montrant la ségrégation des sites *dif*1 et *dif*2 et la localisation de FtsK dans la cellule sont indispensables pour venir compléter nos données actuelles. Par ailleurs, il serait intéressant de connaitre les voies de recombinaison impliquées dans le phénotype délétère du mutant *fts*Kc-. Si ce modèle s'avère tangible, il peut donner lieu à de nouvelles interrogations : Pourquoi les monomères de chromosomes de *V. cholerae* sont maintenus tardivement au milieu de la cellule ? Comment FtsK peut-elle agir pour protéger l'ADN contre des évènements de recombinaison homologue ?

Chez *E. coli*, la plupart des formes chromosomiques présentes au milieu de la cellule lors de l'activation de FtsK sont des dimères de chromosomes (Kennedy et al., 2008, Perals *et al.*, 2001). Chez *V. cholerae* dans un contexte dépourvu de recombinaison homologue, des formes monomériques de chromosomes sont également présentes au septum lors de l'activation de FtsK. Ces formes monomériques pourraient être des formes libres ou des formes intercaténées par la réplication. En considérant le chromosome II dont la taille est relativement petite par rapport au chromosome d'*E. coli* et dont le mode de ségrégation symétrique est identique à celui d'*E. coli*, il est

difficile de concevoir que des formes monomériques soient toujours présentes au milieu de la cellule au moment de la fermeture du septum. Par contre, le chromosome I suit une chorégraphie asymétrique de ségrégation qui diffère de celle d'*E. coli*. Ce mode de ségrégation asymétrique pourrait retarder la ségrégation des termini du chromosome I. Il est aussi envisageable que la résolution des caténats réplicatifs par TopoIV soit plus tardive chez *V. cholerae* que chez *E. coli*, permettant ainsi à FtsK de se charger sur les caténats réplicatifs des deux chromosomes lors de la fermeture du septum. Finalement, il pourrait exister un mécanisme de cohésion qui maintiendrait les termini des deux chromosomes au septum de division.

Chez *E. coli*, l'activation de la résolution tardive des dimères de chromosomes est probablement liée à la formation d'hexamères de FtsK sur l'ADN lors de la fermeture du septum (Kennedy et al., 2008, Massey et al., 2006). Dans ce cas, c'est l'activité de translocation de l'ADN de FtsK qui est tardive et non l'activation à proprement dit de la recombinaison Xer. Si l'activation de la translocation de FtsK est également tardive chez *V. cholerae*, alors non seulement la résolution des dimères de chromosomes est tardive mais également la translocation des formes monomériques. FtsK pourrait donc avoir un rôle dans la synchronisation de la ségrégation de la région du terminus de réplication des deux chromosomes avant division cellulaire.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Abremski, K., R. Hoess & N. Sternberg, (1983) Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* **32**: 1301-1311.

Arciszewska, L. K., R. A. Baker, B. Hallet & D. J. Sherratt, (2000) Coordinated control of XerC and XerD catalytic activities during Holliday junction resolution. *J Mol Biol* **299**: 391-403.

Arciszewska, L. K., I. Grainge & D. J. Sherratt, (1997) Action of site-specific recombinases XerC and XerD on tethered Holliday junctions. *Embo J* **16**: 3731-3743.

Aussel, L., F. X. Barre, M. Aroyo, A. Stasiak, A. Z. Stasiak & D. Sherratt, (2002) FtsK Is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell* **108**: 195-205.

Azaro, M. A. & A. Landy, (1997) The isomeric preference of Holliday junctions influences resolution bias by lambda integrase. *EMBO J* **16**: 3744-3755.

Bachmann, B. J., (1972) Pedigrees of some mutant strains of Escherichia coli K-12. *Bacteriol Rev* **36**: 525-557.

Barre, F. X., (2007) FtsK and SpoIIIE: the tale of the conserved tails. *Mol Microbiol* **66**: 1051-1055.

Barre, F. X., M. Aroyo, S. D. Colloms, A. Helfrich, F. Cornet & D. J. Sherratt, (2000) FtsK functions in the processing of a Holliday junction intermediate during bacterial chromosome segregation. *Genes Dev* **14**: 2976-2988.

Barre, F. X. & D. Sherratt, (2002) *Xer Site-Specific Recombination : Promoting Chromosome Segregation,* p. 149-161. Mobile DNA II ASM Press.

Barre, F. X. & D. Sherratt, (2005) *Chromosome Dimer Resolution,* p. 513-524. ASM Press.

Basu, A., A. K. Mukhopadhyay, C. Sharma, J. Jyot, N. Gupta, A. Ghosh, S. K. Bhattacharya, Y. Takeda, A. S. Faruque, M. J. Albert & G. Balakrish Nair, (1998) Heterogeneity in the organization of the CTX genetic element in strains of Vibrio cholerae O139 Bengal isolated from Calcutta, India and Dhaka, Bangladesh and its possible link to the dissimilar incidence of O139 cholera in the two locales. *Microb Pathog* **24**: 175-183.

Begg, K. J., S. J. Dewar & W. D. Donachie, (1995) A new Escherichia coli cell division gene, ftsK. *J Bacteriol* **177**: 6211-6222.

Begg, K. J. & W. D. Donachie, (1991) Experiments on chromosome separation and positioning in Escherichia coli. *New Biol* **3**: 475-486.

Bernhardt, T. G. & P. A. de Boer, (2005) SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in E. coli. *Mol Cell* **18**: 555-564.

Bigot, S., J. Corre, J. M. Louarn, F. Cornet & F. X. Barre, (2004) FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein. *Mol Microbiol* **54**: 876-886.

Bigot, S., O. A. Saleh, F. Cornet, J. F. Allemand & F. X. Barre, (2006) Oriented loading of FtsK on KOPS. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 1026-1028.

Bigot, S., O. A. Saleh, C. Lesterlin, C. Pages, M. El Karoui, C. Dennis, M. Grigoriev, J. F. Allemand, F. X. Barre & F. Cornet, (2005) KOPS: DNA motifs that control E. coli chromosome segregation by orienting the FtsK translocase. *Embo J* **24**: 3770-3780.

Bigot, S., V. Sivanathan, C. Possoz, F. X. Barre & F. Cornet, (2007) FtsK, a literate chromosome segregation machine. *Mol Microbiol* **64**: 1434-1441.

Biswas, T., H. Aihara, M. Radman-Livaja, D. Filman, A. Landy & T. Ellenberger, (2005) A structural basis for allosteric control of DNA recombination by lambda integrase. *Nature* **435**: 1059-1066.

Blake, J. A., N. Ganguly & D. J. Sherratt, (1997) DNA sequence of recombinase-binding sites can determine Xer site-specific recombination outcome. *Mol Microbiol* **23**: 387-398.

Blakely, G., S. Colloms, G. May, M. Burke & D. Sherratt, (1991) Escherichia coli XerC recombinase is required for chromosomal segregation at cell division. *New Biol* **3**: 789-798.

Blakely, G., G. May, R. McCulloch, L. K. Arciszewska, M. Burke, S. T. Lovett & D. J. Sherratt, (1993) Two related recombinases are required for site-specific recombination at dif and cer in E. coli K12. *Cell* **75**: 351-361.

Blakely, G. & D. Sherratt, (1996) Determinants of selectivity in Xer site-specific recombination. *Genes Dev* **10**: 762-773.

Blakely, G. W., A. O. Davidson & D. J. Sherratt, (1997) Binding and cleavage of nicked substrates by site-specific recombinases XerC and XerD. *J Mol Biol* **265**: 30-39.

Blakely, G. W., A. O. Davidson & D. J. Sherratt, (2000) Sequential strand exchange by XerC and XerD during site-specific recombination at dif. *J Biol Chem* **275**: 9930-9936.

Bouvier, M., G. Demarre & D. Mazel, (2005) Integron cassette insertion: a recombination process involving a folded single strand substrate. *Embo J* **24**: 4356-4367.

Bregu, M., D. J. Sherratt & S. D. Colloms, (2002) Accessory factors determine the order of strand exchange in Xer recombination at psi. *EMBO J* **21**: 3888-3897.

Britton, R. A. & A. D. Grossman, (1999) Synthetic lethal phenotypes caused by mutations affecting chromosome partitioning in Bacillus subtilis. *J Bacteriol* **181**: 5860-5864.

Bui, D., J. Ramiscal, S. Trigueros, J. S. Newmark, A. Do, D. J. Sherratt & M. E. Tolmasky, (2006) Differences in resolution of mwr-containing plasmid dimers mediated by the Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli XerC recombinases: potential implications in dissemination of antibiotic resistance genes. *J Bacteriol* **188**: 2812-2820.

Capiaux, H., F. Cornet, J. Corre, M. I. Guijo, K. Perals, J. E. Rebollo & J. M. Louarn, (2001) Polarization of the Escherichia coli chromosome. A view from the terminus. *Biochimie* **83**: 161-170.

Capiaux, H., C. Lesterlin, K. Perals, J. M. Louarn & F. Cornet, (2002) A dual role for the FtsK protein in Escherichia coli chromosome segregation. *EMBO Rep* **3**: 532-536.

Casjens, S., (1998) The diverse and dynamic structure of bacterial genomes. *Annu Rev Genet* **32**: 339-377.

Chaconas, G., P. E. Stewart, K. Tilly, J. L. Bono & P. Rosa, (2001) Telomere resolution in the Lyme disease spirochete. *EMBO J* **20**: 3229-3237.

Chalker, A. F., A. Lupas, K. Ingraham, C. Y. So, R. D. Lunsford, T. Li, A. Bryant, D. J. Holmes, A. Marra, S. C. Pearson, J. Ray, M. K. Burnham, L. M. Palmer, S. Biswas & M. Zalacain, (2000) Genetic characterization of gram-positive homologs of the XerCD site-specific recombinases. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**: 225-233.

Chen, Y., U. Narendra, L. E. Iype, M. M. Cox & P. A. Rice, (2000) Crystal structure of a Flp recombinase-Holliday junction complex: assembly of an active oligomer by helix swapping. *Mol Cell* **6**: 885-897.

Clerget, M., (1991) Site-specific recombination promoted by a short DNA segment of plasmid R1 and by a homologous segment in the terminus region of the Escherichia coli chromosome. *New Biol* **3**: 780-788.

Colloms, S. D., J. Bath & D. J. Sherratt, (1997) Topological selectivity in Xer site-specific recombination. *Cell* **88**: 855-864.

Colloms, S. D., R. McCulloch, K. Grant, L. Neilson & D. J. Sherratt, (1996) Xer-mediated site-specific recombination in vitro. *Embo J* **15**: 1172-1181.

Colloms, S. D., P. Sykora, G. Szatmari & D. J. Sherratt, (1990) Recombination at ColE1 cer requires the Escherichia coli xerC gene product, a member of the lambda integrase family of site-specific recombinases. *J Bacteriol* **172**: 6973-6980.

Cook, W. R. & L. I. Rothfield, (1999) Nucleoid-independent identification of cell division sites in Escherichia coli. *J Bacteriol* **181**: 1900-1905.

Cornet, F., B. Hallet & D. J. Sherratt, (1997) Xer recombination in Escherichia coli. Site-specific DNA topoisomerase activity of the XerC and XerD recombinases. *J Biol Chem* **272**: 21927-21931.

Cornet, F., J. Louarn, J. Patte & J. M. Louarn, (1996) Restriction of the activity of the recombination site dif to a small zone of the Escherichia coli chromosome. *Genes Dev* **10**: 1152-1161.

Cornet, F., I. Mortier, J. Patte & J. M. Louarn, (1994) Plasmid pSC101 harbors a recombination site, psi, which is able to resolve plasmid multimers and to substitute for the analogous chromosomal Escherichia coli site dif. *J Bacteriol* **176**: 3188-3195.

Corre, J., F. Cornet, J. Patte & J. M. Louarn, (1997) Unraveling a region-specific hyper-recombination phenomenon: genetic control and modalities of terminal recombination in Escherichia coli. *Genetics* **147**: 979-989.

Corre, J. & J. M. Louarn, (2002) Evidence from terminal recombination gradients that FtsK uses replichore polarity to control chromosome terminus positioning at division in Escherichia coli. *J Bacteriol* **184**: 3801-3807.

Corre, J. & J. M. Louarn, (2005) Extent of the activity domain and possible roles of FtsK in the Escherichia coli chromosome terminus. *Mol Microbiol* **56**: 1539-1548.

Corre, J., J. Patte & J. M. Louarn, (2000) Prophage lambda induces terminal recombination in Escherichia coli by inhibiting chromosome dimer resolution. An orientation-dependent cis-effect lending support to bipolarization of the terminus. *Genetics* **154**: 39-48.

Cox, M. M., M. F. Goodman, K. N. Kreuzer, D. J. Sherratt, S. J. Sandler & K. J. Marians, (2000) The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* **404**: 37-41.

Cromie, G. A. & D. R. Leach, (2000) Control of crossing over. *Mol Cell* **6**: 815-826.

Cui, T., N. Moro-oka, K. Ohsumi, K. Kodama, T. Ohshima, N. Ogasawara, H. Mori, B. Wanner, H. Niki & T. Horiuchi, (2007) Escherichia coli with a linear genome. *EMBO Rep* **8**: 181-187.

Danilova, O., R. Reyes-Lamothe, M. Pinskaya, D. Sherratt & C. Possoz, (2007) MukB colocalizes with the oriC region and is required for organization of the two Escherichia coli chromosome arms into separate cell halves. *Mol Microbiol* **65**: 1485-1492.

Davis, B. M., H. H. Kimsey, A. V. Kane & M. K. Waldor, (2002) A satellite phage-encoded antirepressor induces repressor aggregation and cholera toxin gene transfer. *Embo J* **21**: 4240-4249.

Davis, B. M., K. E. Moyer, E. F. Boyd & M. K. Waldor, (2000) CTX prophages in classical biotype Vibrio cholerae: functional phage genes but dysfunctional phage genomes. *J Bacteriol* **182**: 6992-6998.

Davis, B. M. & M. K. Waldor, (2000) CTXphi contains a hybrid genome derived from tandemly integrated elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8572-8577.

Davis, B. M. & M. K. Waldor, (2003) Filamentous phages linked to virulence of Vibrio cholerae. *Curr Opin Microbiol* **6**: 35-42.

Demarre, G., A. M. Guerout, C. Matsumoto-Mashimo, D. A. Rowe-Magnus, P. Marliere & D. Mazel, (2005) A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncPalpha) conjugative machineries and their cognate Escherichia coli host strains. *Res Microbiol* **156**: 245-255.

Diez, A. A., A. Farewell, U. Nannmark & T. Nystrom, (1997) A mutation in the ftsK gene of Escherichia coli affects cell-cell separation, stationary-phase survival, stress adaptation, and expression of the gene encoding the stress protein UspA. *J Bacteriol* **179**: 5878-5883.

Draper, G. C., N. McLennan, K. Begg, M. Masters & W. D. Donachie, (1998) Only the N-terminal domain of FtsK functions in cell division. *J. Bacteriol.* **180**: 4621-4627.

Dryselius, R., K. Kurokawa & T. Iida, (2007) Vibrionaceae, a versatile bacterial family with evolutionarily conserved variability. *Res Microbiol* **158**: 479-486.

Dubarry, N., F. Pasta & D. Lane, (2006) ParABS systems of the four replicons of Burkholderia cenocepacia: new chromosome centromeres confer partition specificity. *J Bacteriol* **188**: 1489-1496.

Duigou, S., K. G. Knudsen, O. Skovgaard, E. S. Egan, A. Lobner-Olesen & M. K. Waldor, (2006) Independent control of replication initiation of the two Vibrio cholerae chromosomes by DnaA and RctB. *J Bacteriol* **188**: 6419-6424.

Durbin, R., (1998) *Biological sequence analysis : probabalistic models of proteins and nucleic acids,* p. xi, 356 p. Cambridge University Press, Cambridge, UK New York.

Edelstein, M., F. Gehrke, S. Hopf, M. Jehl, A. Oswald & T. Rattei, (2003) Genome Skew. In., pp.

Egan, E. S., S. Duigou & M. K. Waldor, (2006) Autorepression of RctB, an Initiator of Vibrio cholerae Chromosome II Replication. *J Bacteriol* **188**: 789-793.

Egan, E. S., M. A. Fogel & M. K. Waldor, (2005) Divided genomes: negotiating the cell cycle in prokaryotes with multiple chromosomes. *Mol Microbiol* **56**: 1129-1138.

Egan, E. S., A. Lobner-Olesen & M. K. Waldor, (2004) Synchronous replication initiation of the two Vibrio cholerae chromosomes. *Curr Biol* **14**: R501-502.

Egan, E. S. & M. K. Waldor, (2003) Distinct replication requirements for the two Vibrio cholerae chromosomes. *Cell* **114**: 521-530.

Espeli, O., C. Lee & K. J. Marians, (2003a) A physical and functional interaction between Escherichia coli FtsK and topoisomerase IV. *J Biol Chem* **278**: 44639-44644.

Espeli, O., C. Levine, H. Hassing & K. J. Marians, (2003b) Temporal regulation of topoisomerase IV activity in E. coli. *Mol Cell* **11**: 189-201.

Espeli, O. & K. J. Marians, (2004) Untangling intracellular DNA topology. *Mol Microbiol* **52**: 925-931.
Esposito, D. & J. J. Scocca, (1997) The integrase family of tyrosine recombinases: evolution of a conserved active site domain. *Nucleic Acids Res* **25**: 3605-3614.
Ferreira, H., B. Butler-Cole, A. Burgin, R. Baker, D. J. Sherratt & L. K. Arciszewska, (2003) Functional analysis of the C-terminal domains of the site-specific recombinases XerC and XerD. *J Mol Biol* **330**: 15-27.
Fogel, M. A. & M. K. Waldor, (2005) Distinct segregation dynamics of the two Vibrio cholerae chromosomes. *Mol Microbiol* **55**: 125-136.
Fogel, M. A. & M. K. Waldor, (2006) A dynamic, mitotic-like mechanism for bacterial chromosome segregation. *Genes Dev* **20**: 3269-3282.
Gally, D. L., J. Leathart & I. C. Blomfield, (1996) Interaction of FimB and FimE with the fim switch that controls the phase variation of type 1 fimbriae in Escherichia coli K-12. *Mol Microbiol* **21**: 725-738.
Gonzalez, M. D., C. A. Lichtensteiger, R. Caughlan & E. R. Vimr, (2002) Conserved filamentous prophage in Escherichia coli O18:K1:H7 and Yersinia pestis biovar orientalis. *J Bacteriol* **184**: 6050-6055.
Gopaul, D. N. & G. D. Duyne, (1999) Structure and mechanism in site-specific recombination. *Curr Opin Struct Biol* **9**: 14-20.
Gopaul, D. N., F. Guo & G. D. Van Duyne, (1998) Structure of the Holliday junction intermediate in Cre-loxP site-specific recombination. *Embo J* **17**: 4175-4187.
Grainge, I., M. Bregu, M. Vazquez, V. Sivanathan, S. C. Ip & D. J. Sherratt, (2007) Unlinking chromosome catenanes in vivo by site-specific recombination. *EMBO J* **26**: 4228-4238.
Grindley, N. D., K. L. Whiteson & P. A. Rice, (2006) Mechanisms of Site-Specific Recombination. *Annu Rev Biochem*.
Grompone, G., V. Bidnenko, S. D. Ehrlich & B. Michel, (2004) PriA is essential for viability of the Escherichia coli topoisomerase IV parE10(Ts) mutant. *J Bacteriol* **186**: 1197-1199.
Guo, F., D. N. Gopaul & G. D. van Duyne, (1997) Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature* **389**: 40-46.
Guo, F., D. N. Gopaul & G. D. Van Duyne, (1999) Asymmetric DNA bending in the Cre-loxP site-specific recombination synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 7143-7148.
Hallet, B., L. K. Arciszewska & D. J. Sherratt, (1999) Reciprocal control of catalysis by the tyrosine recombinases XerC and XerD: an enzymatic switch in site-specific recombination. *Mol Cell* **4**: 949-959.
Hallet, B. & D. J. Sherratt, (1997) Transposition and site-specific recombination: adapting DNA cut-and-paste mechanisms to a variety of genetic rearrangements. *FEMS Microbiol Rev* **21**: 157-178.
Halpern, D., H. Chiapello, S. Schbath, S. Robin, C. Hennequet-Antier, A. Gruss & M. El Karoui, (2007) Identification of DNA motifs implicated in maintenance of bacterial core genomes by predictive modeling. *PLoS Genet* **3**: 1614-1621.
Hayes, F., S. A. Lubetzki & D. J. Sherratt, (1997) Salmonella typhimurium specifies a circular chromosome dimer resolution system which is homologous to the Xer site-specific recombination system of Escherichia coli. *Gene* **198**: 105-110.
Heidelberg, J. F., J. A. Eisen, W. C. Nelson, R. A. Clayton, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, L. Umayam, S. R. Gill, K. E. Nelson, T. D. Read, H. Tettelin, D. Richardson, M. D. Ermolaeva, J.

Vamathevan, S. Bass, H. Qin, I. Dragoi, P. Sellers, L. McDonald, T. Utterback, R. D. Fleishmann, W. C. Nierman, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, R. R. Colwell, J. J. Mekalanos, J. C. Venter & C. M. Fraser, (2000) DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen Vibrio cholerae. *Nature* **406**: 477-483.

Heilpern, A. J. & M. K. Waldor, (2000) CTXphi infection of Vibrio cholerae requires the tolQRA gene products. *J Bacteriol* **182**: 1739-1747.

Hendricks, E. C., H. Szerlong, T. Hill & P. Kuempel, (2000) Cell division, guillotining of dimer chromosomes and SOS induction in resolution mutants (dif, xerC and xerD) of Escherichia coli. *Mol Microbiol* **36**: 973-981.

Hiasa, H. & K. J. Marians, (1996) Two distinct modes of strand unlinking during theta-type DNA replication. *J Biol Chem* **271**: 21529-21535.

Hickman, A. B., S. Waninger, J. J. Scocca & F. Dyda, (1997) Molecular organization in site-specific recombination: the catalytic domain of bacteriophage HP1 integrase at 2.7 A resolution. *Cell* **89**: 227-237.

Hojgaard, A., H. Szerlong, C. Tabor & P. Kuempel, (1999) Norfloxacin-induced DNA cleavage occurs at the dif resolvase locus in Escherichia coli and is the result of interaction with topoisomerase IV. *Mol Microbiol* **33**: 1027-1036.

Huber, K. E. & M. K. Waldor, (2002) Filamentous phage integration requires the host recombinases XerC and XerD. *Nature* **417**: 656-659.

Ip, S. C., M. Bregu, F. X. Barre & D. J. Sherratt, (2003) Decatenation of DNA circles by FtsK-dependent Xer site-specific recombination. *Embo J* **22**: 6399-6407.

Jensen, R. B., (2006) Analysis of the terminus region of the Caulobacter crescentus chromosome and identification of the dif site. *J Bacteriol* **188**: 6016-6019.

Jensen, R. B., S. C. Wang & L. Shapiro, (2001) A moving DNA replication factory in Caulobacter crescentus. *EMBO J* **20**: 4952-4963.

Jouan, L. & G. Szatmari, (2003) Interactions of the Caulobacter crescentus XerC and XerD recombinases with the E. coli dif site. *FEMS Microbiol Lett* **222**: 257-262.

Karaolis, D. K., J. A. Johnson, C. C. Bailey, E. C. Boedeker, J. B. Kaper & P. R. Reeves, (1998) A Vibrio cholerae pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3134-3139.

Karaolis, D. K., R. Lan, J. B. Kaper & P. R. Reeves, (2001) Comparison of Vibrio cholerae pathogenicity islands in sixth and seventh pandemic strains. *Infect Immun* **69**: 1947-1952.

Karaolis, D. K., S. Somara, D. R. Maneval, Jr., J. A. Johnson & J. B. Kaper, (1999) A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. *Nature* **399**: 375-379.

Keller, K. L., T. L. Overbeck-Carrick & D. J. Beck, (2001) Survival and induction of SOS in Escherichia coli treated with cisplatin, UV-irradiation, or mitomycin C are dependent on the function of the RecBC and RecFOR pathways of homologous recombination. *Mutat Res* **486**: 21-29.

Kennedy, S. P., F. Chevalier & F. X. Barre, (2008) Delayed activation of Xer recombination at dif by FtsK during septum assembly in Escherichia coli. *Mol Microbiol*.

Kimsey, H. H. & M. K. Waldor, (2004) The CTXphi repressor RstR binds DNA cooperatively to form tetrameric repressor-operator complexes. *J Biol Chem* **279**: 2640-2647.

Kobryn, K. & G. Chaconas, (2002) ResT, a telomere resolvase encoded by the Lyme disease spirochete. *Mol Cell* **9**: 195-201.

Kobryn, K. & G. Chaconas, (2005) Fusion of hairpin telomeres by the B. burgdorferi telomere resolvase ResT implications for shaping a genome in flux. *Mol Cell* **17**: 783-791.

Kolodner, R., R. A. Fishel & M. Howard, (1985) Genetic recombination of bacterial plasmid DNA: effect of RecF pathway mutations on plasmid recombination in Escherichia coli. *J Bacteriol* **163**: 1060-1066.

Krogh, B. O. & S. Shuman, (2000) Catalytic mechanism of DNA topoisomerase IB. *Mol Cell* **5**: 1035-1041.

Kuempel, P., A. Hogaard, M. Nielsen, O. Nagappan & M. Tecklenburg, (1996) Use of a transposon (Tndif) to obtain suppressing and nonsuppressing insertions of the dif resolvase site of Escherichia coli. *Genes Dev* **10**: 1162-1171.

Kuempel, P. L., J. M. Henson, L. Dircks, M. Tecklenburg & D. F. Lim, (1991) dif, a recA-independent recombination site in the terminus region of the chromosome of Escherichia coli. *New Biol* **3**: 799-811.

Kusano, K., K. Nakayama & H. Nakayama, (1989) Plasmid-mediated lethality and plasmid multimer formation in an Escherichia coli recBC sbcBC mutant. Involvement of RecF recombination pathway genes. *J Mol Biol* **209**: 623-634.

Le Bourgeois, P., M. Bugarel, N. Campo, M. L. Daveran-Mingot, J. Labonte, D. Lanfranchi, T. Lautier, C. Pages & P. Ritzenthaler, (2007) The Unconventional Xer Recombination Machinery of Streptococci/Lactococci. *PLoS Genet* **3**: e117.

Le Roux, F., J. Binesse, D. Saulnier & D. Mazel, (2007) Construction of a Vibrio splendidus mutant lacking the metalloprotease gene vsm by use of a novel counterselectable suicide vector. *Appl Environ Microbiol* **73**: 777-784.

Lee, L., L. C. Chu & P. D. Sadowski, (2003) Cre induces an asymmetric DNA bend in its target loxP site. *J Biol Chem* **278**: 23118-23129.

Lee, L. & P. D. Sadowski, (2003) Sequence of the loxP site determines the order of strand exchange by the Cre recombinase. *J Mol Biol* **326**: 397-412.

Lee, L. & P. D. Sadowski, (2005) Strand selection by the tyrosine recombinases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **80**: 1-42.

Leslie, N. R. & D. J. Sherratt, (1995) Site-specific recombination in the replication terminus region of Escherichia coli: functional replacement of dif. *EMBO J* **14**: 1561-1570.

Lesterlin, C., R. Mercier, F. Boccard, F. X. Barre & F. Cornet, (2005) Roles for replichores and macrodomains in segregation of the Escherichia coli chromosome. *EMBO Rep* **6**: 557-562.

Letzelter, C., M. Duguet & M. C. Serre, (2004) Mutational analysis of the archaeal tyrosine recombinase SSV1 integrase suggests a mechanism of DNA cleavage in trans. *J Biol Chem* **279**: 28936-28944.

Levy, O., J. L. Ptacin, P. J. Pease, J. Gore, M. B. Eisen, C. Bustamante & N. R. Cozzarelli, (2005) Identification of oligonucleotide sequences that direct the movement of the Escherichia coli FtsK translocase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 17618-17623.

Lin, W., K. J. Fullner, R. Clayton, J. A. Sexton, M. B. Rogers, K. E. Calia, S. B. Calderwood, C. Fraser & J. J. Mekalanos, (1999) Identification of a vibrio cholerae RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1071-1076.

Link, A. J., D. Phillips & G. M. Church, (1997) Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type Escherichia coli:

application to open reading frame characterization. *J Bacteriol* **179**: 6228-6237.
Liu, G., G. C. Draper & W. D. Donachie, (1998) FtsK is a bifunctional protein involved in cell division and chromosome localization in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **29**: 893-903.
Lobry, J. R. & J. M. Louarn, (2003) Polarisation of prokaryotic chromosomes. *Curr Opin Microbiol* **6**: 101-108.
Louarn, J., F. Cornet, V. Francois, J. Patte & J. M. Louarn, (1994) Hyperrecombination in the terminus region of the Escherichia coli chromosome: possible relation to nucleoid organization. *J Bacteriol* **176**: 7524-7531.
Louarn, J. M., J. Louarn, V. Francois & J. Patte, (1991) Analysis and possible role of hyperrecombination in the termination region of the Escherichia coli chromosome. *J Bacteriol* **173**: 5097-5104.
MacDonald, D., G. Demarre, M. Bouvier, D. Mazel & D. N. Gopaul, (2006) Structural basis for broad DNA-specificity in integron recombination. *Nature* **440**: 1157-1162.
Massey, T. H., L. Aussel, F. X. Barre & D. J. Sherratt, (2004) Asymmetric activation of Xer site-specific recombination by FtsK. *EMBO Rep* **5**: 399-404.
Massey, T. H., C. P. Mercogliano, J. Yates, D. J. Sherratt & J. Lowe, (2006) Double-stranded DNA translocation: structure and mechanism of hexameric FtsK. *Mol Cell* **23**: 457-469.
Mazel, D., (2006) Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* **4**: 608-620.
McClintock, B., (1932) A correlation of ring-shaped chromosomes with variegation in Zea mays. *PNAS* **18**: 677-681.
McCool, J. D. & S. J. Sandler, (2001) Effects of mutations involving cell division, recombination, and chromosome dimer resolution on a priA2::kan mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8203-8210.
McCulloch, R., L. W. Coggins, S. D. Colloms & D. J. Sherratt, (1994) Xer-mediated site-specific recombination at cer generates Holliday junctions in vivo. *Embo J* **13**: 1844-1855.
McLeod, S. M., H. H. Kimsey, B. M. Davis & M. K. Waldor, (2005) CTXphi and Vibrio cholerae: exploring a newly recognized type of phage-host cell relationship. *Mol Microbiol* **57**: 347-356.
McLeod, S. M. & M. K. Waldor, (2004) Characterization of XerC- and XerD-dependent CTX phage integration in Vibrio cholerae. *Mol Microbiol* **54**: 935-947.
Moyer, K. E., H. H. Kimsey & M. K. Waldor, (2001) Evidence for a rolling-circle mechanism of phage DNA synthesis from both replicative and integrated forms of CTXphi. *Mol Microbiol* **41**: 311-323.
Nandi, S., D. Maiti, A. Saha & R. K. Bhadra, (2003) Genesis of variants of Vibrio cholerae O1 biotype El Tor: role of the CTXphi array and its position in the genome. *Microbiology* **149**: 89-97.
Neilson, L., G. Blakely & D. J. Sherratt, (1999) Site-specific recombination at dif by Haemophilus influenzae XerC. *Mol Microbiol* **31**: 915-926.
Niki, H., A. Jaffe, R. Imamura, T. Ogura & S. Hiraga, (1991) The new gene mukB codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of E. coli. *EMBO J* **10**: 183-193.

Nunes-Duby, S. E., M. A. Azaro & A. Landy, (1995) Swapping DNA strands and sensing homology without branch migration in lambda site-specific recombination. *Curr Biol* **5**: 139-148.

Nunes-Duby, S. E., L. Matsumoto & A. Landy, (1987) Site-specific recombination intermediates trapped with suicide substrates. *Cell* **50**: 779-788.

Okada, K., T. Iida, K. Kita-Tsukamoto & T. Honda, (2005) Vibrios commonly possess two chromosomes. *J Bacteriol* **187**: 752-757.

Pease, P. J., O. Levy, G. J. Cost, J. Gore, J. L. Ptacin, D. Sherratt, C. Bustamante & N. R. Cozzarelli, (2005) Sequence-directed DNA translocation by purified FtsK. *Science* **307**: 586-590.

Perals, K., H. Capiaux, J. B. Vincourt, J. M. Louarn, D. J. Sherratt & F. Cornet, (2001) Interplay between recombination, cell division and chromosome structure during chromosome dimer resolution in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **39**: 904-913.

Perals, K., F. Cornet, Y. Merlet, I. Delon & J. M. Louarn, (2000) Functional polarization of the Escherichia coli chromosome terminus: the dif site acts in chromosome dimer resolution only when located between long stretches of opposite polarity. *Mol Microbiol* **36**: 33-43.

Perry, K. L., S. J. Elledge, B. B. Mitchell, L. Marsh & G. C. Walker, (1985) umuDC and mucAB operons whose products are required for UV light- and chemical-induced mutagenesis: UmuD, MucA, and LexA proteins share homology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 4331-4335.

Philippe, N., J. P. Alcaraz, E. Coursange, J. Geiselmann & D. Schneider, (2004) Improvement of pCVD442, a suicide plasmid for gene allele exchange in bacteria. *Plasmid* **51**: 246-255.

Postow, L., N. J. Crisona, B. J. Peter, C. D. Hardy & N. R. Cozzarelli, (2001) Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8219-8226.

Ptacin, J. L., M. Nollmann, E. C. Becker, N. R. Cozzarelli, K. Pogliano & C. Bustamante, (2008) Sequence-directed DNA export guides chromosome translocation during sporulation in Bacillus subtilis. *Nat Struct Mol Biol*.

Quinones, M., B. M. Davis & M. K. Waldor, (2006) Activation of the Vibrio cholerae SOS response is not required for intestinal cholera toxin production or colonization. *Infect Immun* **74**: 927-930.

Quinones, M., H. H. Kimsey & M. K. Waldor, (2005) LexA cleavage is required for CTX prophage induction. *Mol Cell* **17**: 291-300.

Rasmussen, T., R. B. Jensen & O. Skovgaard, (2007) The two chromosomes of Vibrio cholerae are initiated at different time points in the cell cycle. *EMBO J* **26**: 3124-3131.

Recchia, G. D., M. Aroyo, D. Wolf, G. Blakely & D. J. Sherratt, (1999) FtsK-dependent and -independent pathways of Xer site-specific recombination. *Embo J* **18**: 5724-5734.

Recchia, G. D. & D. J. Sherratt, (1999) Conservation of xer site-specific recombination genes in bacteria. *Mol Microbiol* **34**: 1146-1148.

Reen, F. J., S. Almagro-Moreno, D. Ussery & E. F. Boyd, (2006) The genomic code: inferring Vibrionaceae niche specialization. *Nat Rev Microbiol* **4**: 697-704.

Sadowski, P., (1986) Site-specific recombinases: changing partners and doing the twist. *J Bacteriol* **165**: 341-347.

Saleh, O. A., C. Perals, F. X. Barre & J. F. Allemand, (2004) Fast, DNA-sequence independent translocation by FtsK in a single-molecule experiment. *Embo J* **23**: 2430-2439.

Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis, (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

SantaLucia, J., Jr., (1998) A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 1460-1465.

Sawitzke, J. & S. Austin, (2001) An analysis of the factory model for chromosome replication and segregation in bacteria. *Mol Microbiol* **40**: 786-794.

Sciochetti, S. A., P. J. Piggot & G. W. Blakely, (2001) Identification and characterization of the dif Site from Bacillus subtilis. *J Bacteriol* **183**: 1058-1068.

Sciochetti, S. A., P. J. Piggot, D. J. Sherratt & G. Blakely, (1999) The ripX locus of Bacillus subtilis encodes a site-specific recombinase involved in proper chromosome partitioning. *J Bacteriol* **181**: 6053-6062.

Senecoff, J. F. & M. M. Cox, (1986) Directionality in FLP protein-promoted site-specific recombination is mediated by DNA-DNA pairing. *J Biol Chem* **261**: 7380-7386.

Serre, M. C., C. Letzelter, J. R. Garel & M. Duguet, (2002) Cleavage properties of an archaeal site-specific recombinase, the SSV1 integrase. *J Biol Chem* **277**: 16758-16767.

Sharpe, M. E. & J. Errington, (1995) Postseptational chromosome partitioning in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 8630-8634.

Sherratt, D. J., L. K. Arciszewska, G. Blakely, S. Colloms, K. Grant, N. Leslie & R. McCulloch, (1995) Site-specific recombination and circular chromosome segregation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **347**: 37-42.

Sivanathan, V., M. D. Allen, C. de Bekker, R. Baker, L. K. Arciszewska, S. M. Freund, M. Bycroft, J. Lowe & D. J. Sherratt, (2006) The FtsK gamma domain directs oriented DNA translocation by interacting with KOPS. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 965-972.

Spiers, A. J. & D. J. Sherratt, (1999) C-terminal interactions between the XerC and XerD site-specific recombinases. *Mol Microbiol* **32**: 1031-1042.

Srivastava, P. & D. K. Chattoraj, (2007) Selective chromosome amplification in Vibrio cholerae. *Mol Microbiol* **66**: 1016-1028.

Srivastava, P., R. A. Fekete & D. K. Chattoraj, (2006) Segregation of the replication terminus of the two Vibrio cholerae chromosomes. *J Bacteriol* **188**: 1060-1070.

Steiner, W., G. Liu, W. D. Donachie & P. Kuempel, (1999) The cytoplasmic domain of FtsK protein is required for resolution of chromosome dimers. *Mol Microbiol* **31**: 579-583.

Steiner, W. W. & P. L. Kuempel, (1998a) Cell division is required for resolution of dimer chromosomes at the dif locus of Escherichia coli. *Mol Microbiol* **27**: 257-268.

Steiner, W. W. & P. L. Kuempel, (1998b) Sister chromatid exchange frequencies in Escherichia coli analyzed by recombination at the dif resolvase site. *J Bacteriol* **180**: 6269-6275.

Stewart, P. S. & R. D'Ari, (1992) Genetic and morphological characterization of an Escherichia coli chromosome segregation mutant. *J Bacteriol* **174**: 4513-4516.

Stirling, C. J., G. Stewart & D. J. Sherratt, (1988a) Multicopy plasmid stability in Escherichia coli requires host-encoded functions that lead to plasmid site-specific recombination. *Mol Gen Genet* **214**: 80-84.

Stirling, C. J., G. Szatmari, G. Stewart, M. C. Smith & D. J. Sherratt, (1988b) The arginine repressor is essential for plasmid-stabilizing site-specific recombination at the ColE1 cer locus. *EMBO J* **7**: 4389-4395.

Summers, D. K., C. W. Beton & H. L. Withers, (1993) Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis. *Mol Microbiol* **8**: 1031-1038.

Summers, D. K. & D. J. Sherratt, (1984) Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell* **36**: 1097-1103.

Summers, D. K. & D. J. Sherratt, (1988) Resolution of ColE1 dimers requires a DNA sequence implicated in the three-dimensional organization of the cer site. *EMBO J* **7**: 851-858.

Tecklenburg, M., A. Naumer, O. Nagappan & P. Kuempel, (1995) The dif resolvase locus of the Escherichia coli chromosome can be replaced by a 33-bp sequence, but function depends on location. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1352-1356.

Thompson, J. D., D. G. Higgins & T. J. Gibson, (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.

Val, M. E., M. Bouvier, J. Campos, D. Sherratt, F. Cornet, D. Mazel & F. X. Barre, (2005) The single-stranded genome of phage CTX is the form used for integration into the genome of Vibrio cholerae. *Mol Cell* **19**: 559-566.

Val, M. E., S. P. Kennedy, M. El Karoui, L. Bonne, F. Chevalier & F. X. Barre, (submitted) FtsK-dependent dimer resolution on multiple chromosomes in the pathogen Vibrio cholerae.

Van Duyne, G. D., (2002) *A Structural View of Tyrosine Recombinase Site-Specific Recombination,* p. 93-117. ASM Press.

Van Duyne, G. D., (2005) Lambda integrase: armed for recombination. *Curr Biol* **15**: R658-660.

Vanhooff, V., C. Galloy, H. Agaisse, D. Lereclus, B. Revet & B. Hallet, (2006) Self-control in DNA site-specific recombination mediated by the tyrosine recombinase TnpI. *Mol Microbiol* **60**: 617-629.

Villion, M. & G. Szatmari, (1998) Cloning and characterisation of the Proteus mirabilis xerD gene. *FEMS Microbiol Lett* **164**: 83-90.

Villion, M. & G. Szatmari, (2003) The XerC recombinase of Proteus mirabilis: characterization and interaction with other tyrosine recombinases. *FEMS Microbiol Lett* **226**: 65-71.

Volkert, F. C., L. C. Wu, P. A. Fisher & J. R. Broach, (1986) Survival strategies of the yeast plasmid two-micron circle. *Basic Life Sci* **40**: 375-396.

Waldor, M. K. & D. I. Friedman, (2005) Phage regulatory circuits and virulence gene expression. *Curr Opin Microbiol* **8**: 459-465.

Waldor, M. K. & J. J. Mekalanos, (1996) Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* **272**: 1910-1914.

Wang, S. C., L. West & L. Shapiro, (2006) The bifunctional FtsK protein mediates chromosome partitioning and cell division in Caulobacter. *J Bacteriol* **188**: 1497-1508.

Warren, G. J. & A. J. Clark, (1980) Sequence-specific recombination of plasmid ColE1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 6724-6728.
Xu, Q., M. Dziejman & J. J. Mekalanos, (2003) Determination of the transcriptome of Vibrio cholerae during intraintestinal growth and midexponential phase in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 1286-1291.
Yamaichi, Y., M. A. Fogel & M. K. Waldor, (2007) par genes and the pathology of chromosome loss in Vibrio cholerae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 630-635.
Yates, J., M. Aroyo, D. J. Sherratt & F. X. Barre, (2003) Species specificity in the activation of Xer recombination at dif by FtsK. *Mol Microbiol* **49**: 241-249.
Yates, J., I. Zhekov, R. Baker, B. Eklund, D. J. Sherratt & L. K. Arciszewska, (2006) Dissection of a functional interaction between the DNA translocase, FtsK, and the XerD recombinase. *Mol Microbiol* **59**: 1754-1766.
Yu, X. C., E. K. Weihe & W. Margolin, (1998) Role of the C terminus of FtsK in Escherichia coli chromosome segregation. *J Bacteriol* **180**: 6424-6428.
Zusman, D. R., A. Carbonell & J. Y. Haga, (1973) Nucleoid condensation and cell division in Escherichia coli MX74T2 ts52 after inhibition of protein synthesis. *J Bacteriol* **115**: 1167-1178.

RESUME

La plupart des bactéries ont un unique chromosome circulaire. Lors de la réplication, des dimères de chromosome peuvent se former par crossover entre chromatides sœurs. La dimérisation des chromosomes empêche la ségrégation de l'information génétique entre les deux cellules filles. Pour empêcher cela, les recombinases à tyrosine, XerC et XerD, résolvent les dimères de chromosomes en ajoutant un crossover au niveau d'un site spécifique du chromosome, appelé *dif*. Chez *Escherichia coli*, la résolution des dimères de chromosomes est coordonnée à la division cellulaire par une protéine septale, FtsK. FtsK pompe l'ADN chromosomique du dimère au travers du septum de division jusqu'à mise en contact des deux sites *dif* que le dimère porte, puis FtsK active la recombinaison XerC/D pour résoudre le dimère en deux chromosomes monomériques ségrégeables.

Vibrio cholerae possède deux chromosomes circulaires portant chacun un site *dif* différent, *dif*1 pour le chromosome I et *dif*2 pour le chromosome II. Le système de résolution des dimères de chromosomes doit donc faire face dans cet organisme à un degré de complexité plus élevé pour assurer la ségrégation de deux chromosomes. D'autre part, *V. cholerae* est l'agent responsable du cholera. La toxine cholérique, qui provoque les diarrhées mortelles du choléra, est codée par le phage tempéré CTXφ. CTXφ s'intègre dans le génome de son hôte au niveau du site *dif*, en détournant l'action des deux recombinases XerC et XerD de leur fonction de maintenance. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'étude du système de résolution des dimères de chromosomes chez *V. cholerae* à la fois pour comprendre son rôle dans le cycle cellulaire normale de cette bactérie "bi-chromosomique", mais aussi pour comprendre sa contribution à l'intégration du phage CTXφ et donc à l'émergence de nouveaux variants pathogènes.

Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir comment le phage CTXφ détourne les recombinases XerC/D pour s'intégrer dans le génome de son hôte. Nos travaux montrent que le génome simple brin du phage possède une région capable de former une structure secondaire reconstituant un site *dif*, qui est pris en charge par les recombinases XerC/D pour être recombinée avec le site *dif* bactérien. A travers cette étude, nous avons découvert un nouveau mode de transfert horizontal d'ADN.

Dans un second temps, nous avons montré que la résolution des dimères des deux chromosomes de *V. cholerae* suit une même voie recombinationnelle, qui est contrôlée par la protéine septale FtsK. Ceci est le premier exemple d'un système commun de maintenance de multiples chromosomes chez les bactéries. Cela suggère aussi une synchronisation de la résolution des dimères des deux chromosomes au cycle cellulaire de la bactérie.

Enfin, chez *E. coli*, le rôle de translocation de FtsK dans la ségrégation des chromosomes est apparemment limité au seul besoin de contrôler la résolution des dimères de chromosomes. Au contraire, mes travaux montrent un rôle plus général de la fonction de translocation de FtsK dans la ségrégation des chromosomes chez *V. cholerae*.