



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*

Discipline ou Spécialité : Microbiologie et génétique moléculaire

Présentée et soutenue par AH-SENG Yoan

Le 1^{er} octobre 2010

Titre : La ségrégation du plasmide F d'*Escherichia coli*:
Régulation de l'activité ATPase de la protéine moteur de partition SopA

JURY

M. GUTIERREZ Claude,	Président du jury
M. MAZEL Didier,	Rapporteur
M. ESPELI Olivier,	Rapporteur
M. CARBALLIDO-LOPEZ Rut,	Examinatrice
M. LANE Dave,	Directeur de thèse
M. BOUET Jean-Yves,	Co-directeur de thèse

Ecole doctorale : Biologie Santé Biotechnologie

Unité de recherche : Laboratoire de Microbiologie et de Génétiques Moléculaires

Co-directeur de thèse : LANE Dave

Co-directeur de thèse : BOUET Jean-Yves

Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord à ma famille et à mes amis. Merci à mes parents, qui ont toujours été présents pour moi. Merci de m'avoir aidé au cours de ces années d'étude. Merci à Emmanuelle qui partage ma vie et qui m'a soutenu tout au long de ma thèse. Merci à mes frères et à mes amis qui se sont déplacés pour ma soutenance. Merci à vous qui avez contribué à ce que les festivités soient une grande réussite. Et pour finir ce côté familial, j'ai une petite pensée pour mes grands-parents et à mes amis qui m'ont soutenu de la Réunion.

Pour le côté boulot, merci à Philou de m'avoir donné ma chance dans le monde de la recherche et m'a ainsi permis de poursuivre mes études. Merci à Dave pour m'avoir accueilli dans l'équipe dynamique des réplicons bactériens au cours de mon M2R et ma thèse. Merci pour ta confiance et tes conseils. Merci à Jean-Yves mon encadrant de M2R et de thèse. Merci de m'avoir guidé au cours de ces années tout en me laissant une liberté dans mon travail. Merci à Franck pour nos échanges plaisants et fructueux. Merci aussi pour ta participation dans ma formation de moniteur, j'en garde un très bon souvenir. Merci à mes acolytes JP et Jérôme. Ma thèse ne serait pas aussi plaisant sans nos parties de délires et de rigolades. Merci à Aurore ma première stagiaire pour ta convivialité et ta rigueur au travail. Merci à toutes les personnes qui font et qui ont fait partie de l'équipe (Nelly, Tim, Fanny, Wen Li ...). Merci à Chantal pour ton amitié, ta convivialité et tes cours de français. Ce fut un vrai plaisir de te côtoyer au cours de ces années. Merci à mon acolyte et ami d'en face, JC. Merci à mon acolyte et amie d'en bas, Kounthea. Et pour finir, merci à toutes les personnes que j'ai côtoyé à l'IBCG (Sophie, Stéphanie, Soraya, Sabrina, Mathieu (x2), Carine, Anne-Lise, Dana, Audrey (x2), Patricia, Marie-Pierre, Violette, Laure, Elsa, Prya, Jérôme (l'autre), Sylvia, Ana, Natalia, Nacer ...). Merci pour votre amitié, votre collaboration et tout ce qui a pu rendre ces années agréables pour moi.

Je clôture cette page de remerciement avec ce petit sentiment. Contrairement à ce que beaucoup de personnes peuvent penser, les moments de détente au travail

ne sont pas des contraintes à la productivité. Faire des pauses dans la journée pour parler d'autres choses que de la science a été productif pour moi. Merci à tous ceux qui y ont contribué.

Résumé

La ségrégation, ou partition, des chromosomes et des plasmides bactériens est l'étape fondamentale du cycle cellulaire qui assure la transmission de l'ensemble du génome aux cellules filles. C'est l'équivalent procaryote de la mitose. Des systèmes de ségrégation, appelés les loci *par*, ont été identifiés sur les plasmides à bas nombre de copies, et des homologues de ces systèmes de partition sont présents sur la majorité des chromosomes bactériens. Le système code deux protéines, une ATPase et une protéine qui se fixe spécifiquement sur une région centromérique. Ces deux protéines interagissent entre elles, permettent la localisation subcellulaire des réplicons et assurent ainsi leur maintien dans les générations futures. Au laboratoire, nous étudions l'un des systèmes modèles majeurs, le système de partition du plasmide F d'*Escherichia coli*, afin de déterminer le mécanisme moléculaire assurant le processus de ségrégation et son contrôle pendant le cycle cellulaire.

La stabilité du plasmide F est assurée par le système de partition *sopABC*. Après la réplication du plasmide, la protéine SopB s'assemble sur le centromère *sopC* pour former un complexe de partition qui permet aux copies du plasmide d'être positionnés au centre de la cellule. Avant la division cellulaire les plasmides migrent aux positions $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ de la cellule et assurent ainsi l'héritage des réplicons dans les futures cellules filles. L'ATPase SopA est essentielle dans le processus de partition, mais son rôle n'est pas bien défini. SopA pourrait être impliquée dans les étapes de positionnement et/ou de déplacement des plasmides de part et d'autre de la cellule. SopA possède plusieurs activités. *In vivo*, SopA agit comme autorépresseur de l'opéron *sopAB* en se fixant sur la région promotrice. De plus elle interagit avec le complexe de partition et forme des polymères en présence d'ATP. Nous avons montré que cette activité est régulée par SopB et par l'ADN.

L'activité ATPase de SopA est essentielle pour la partition. Elle est légèrement stimulée par SopB et par l'ADN, mais lorsque ces deux facteurs sont présents, elle est fortement stimulée. Nous avons entrepris de caractériser les interactions existantes entre ces trois protagonistes. Ainsi, nous avons démontré que cette stimulation nécessite une interaction de SopA avec SopB d'une part et avec l'ADN d'autre part. Nous avons également montré que le site centromérique *sopC* potentialise la

stimulation de l'activité ATPase par l'intermédiaire de SopB. Nous nous sommes intéressés ensuite à l'interaction SopA-SopB, et nous avons mis en évidence que SopB stimule l'activité ATPase de SopA via un motif arginine finger. Pour finir, nous avons montré que *in vivo*, la stimulation de l'activité ATPase de SopA joue un rôle dans la régulation de l'opéron *sopAB* mais aussi dans la partition du plasmide F.

Abstract

Mitotic segregation of chromosomes and plasmids, termed partition in bacteria, is a fundamental step of the cell cycle that ensures the transmission of the whole genome to daughter cells. It is governed by specific genetic loci named *par*, first identified in low copy number plasmids and later found to be present as homologues in most bacterial chromosomes. *Par* loci encode two proteins, an ATPase and a DNA binding protein, and include a *cis*-acting centromeric site. These components interact with each other to direct the subcellular localization that ensures stability of their replicons. To determine the molecular mechanisms of the partition process and its control during the cell cycle, we study the *Sop* partition system of the *Escherichia coli* plasmid, F.

Sop is one of the best-known partition systems. After F plasmid replication, SopB protein binds to the *sopC* centromeric site to form a partition complex. The complex on each plasmid copy interacts with SopA, an ATPase, and activates it to move the plasmid molecules towards the two cell poles. SopA ATPase is essential to the segregation process but its role is not defined. SopA has many activities. *In vivo* it represses its own operon by binding to the *sopAB* promoter. Moreover, in addition to its interaction with the partition complex it polymerizes in the presence of ATP. We have shown that SopB and DNA regulate this activity.

Although the ATP-binding site on SopA is essential for partition, ATP hydrolysis by SopA is very weak. It is stimulated modestly by DNA and by SopB and strongly in the presence of both. We have characterized the interactions necessary for stimulation of ATP hydrolysis. First we found that the SopB-*sopC* partition complex is required for maximal stimulation. Then we showed that SopB and DNA contact SopA by two distinct interactions to fully activate ATPase activity. We also found that SopB activates SopA ATPase through an arginine finger motif. Finally, we have shown that *in vivo*, stimulation of the ATPase activity is necessary for both regulation of the *sopAB* operon and partition of plasmid F to be efficient.

Abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adénosine DriPhosphate
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine TriPhosphate
Da	Dalton
FIS	Factor for Inversion Stimulation
FISH	Fluorescent In Situ Hybridation
FROS	Fluorescent Repressor-Operator System
GDP	Guanosine DriPhosphate
GTP	Guanosine TriPhosphate
H-NS	Heat-stable Nucleoid-Structuring protein
HU	Heat-Unstable protéin
HTH	Helix-Turn-Helix
IHF	Integration Host Factor
kb	Kilobase
Mb	Mégabase
ME	Microscopie Electronique
mm	Millimètre
NAPs	Nucleoid Associated Proteins
oriC	Origine chromosomique
pb	Paire de bases
SPR	Résonance Plasmon de Surface
RHH	Ribbon-Helix-Helix
SMC	Structural Maintenance of Chromosomes
ter	Terminus

Table des figures

1	L'organisation du génome d' <i>Escherichia coli</i>	6
2	Modèle de ségrégation des chromosomes de <i>Bacillus Subtilis</i> et d' <i>Escherichia coli</i> en croissance lente	12
3	La réplication bidirectionnelle par le mécanisme thêta	16
4	Organisation de la région contenant l'origine de réplication du plasmide F	18
5	Contrôle de la réplication du plasmide R1 par ARN antisens	20
6	Localisation intracellulaire du plasmide mini-F par hybrida- tion <i>in situ</i> (FISH)	22
7	Organisation génétique des opérons <i>par</i> de type I et II	24
8	Modèle proposé pour la ségrégation des chromosomes bactériens	31
9	Représentation de diverses régions centromériques	32
10	Sites centromériques <i>sopC</i> et <i>parS</i> du plasmide F et du pro- phage P1	32
11	Séquences conservées et domaines fonctionnelles de (a) ParA de P1 et (b) ParB de P1	35
12	Structure de ParB (142-324) de P1	36
13	Strucutre de dimère de ParB (142-324) fixé à l'ADN	37
14	Séquences conservées et domaines fonctionnelles de (a) SopA de F et (b) SopB de F	39
15	Structure de SopB(155-272) et de SopB(275-323)	40
16	Structure de ParA de P1	41
17	Structure de liaison au centromère de type II	43
18	Structure de ParM et des filaments de ParM	45
19	Modèle de la polymérisation de ParM en « marche d'escalier »	47
20	Modèle de la partition du plasmide R1	47
21	Appariement de plasmides R1	49
22	Modèle de l'étalement des protéine ParB autour du site cen- tromérique	52

23	Régions promotrices des opérons <i>sop</i> et <i>par</i> des plasmide F et P1	59
24	Le modèle décrit le contrôle des activités de ParA par la fixation des nucléotides d'adénines	63
25	Représentation schématique du mécanisme de réaction diffusion	64
26	Oscillation et structure hélicoïdale de ParA de pB171	65
27	Modèle pour l'oscillation de SopA et de SopB	69
28	Analyse des mouvements de SopA et du plasmide F	70
29	Filament de ParA plasmidique en présence d'ATP	71
30	Filament de ParA ₂ du chromosome 2 de <i>Vibrio cholerae</i>	72
31	Filament de Soj du chromosome <i>Thermus thermophilus</i>	73
32	Modèle pour l'initiation des polymères de SopA <i>in vivo</i>	75
33	Observation des filaments de SopA en présence du complexe de partition en microscopie électronique	98
34	Observation des filaments de SopA en présence d'ATP en microscopie électronique	100
35	Observation des filaments de SopA-D145A en présence du complexe de partition en microscopie électronique	102
36	Représentation de la structure de RuvB fixé à l'ADP	106
37	Représentation de la structure de l'hélicase Gp4 fixé au dTTP	108
38	Représentation de la structure de Rep40 de AAV2	109
39	Modèle pour l'activation de l'activité ATPase de SopA	124
40	Quantification de SopA et de SopB sous le contrôle du promoteur <i>pSop</i>	128
41	Quantification de SopA et de SopB sous le contrôle du promoteur <i>pSop</i> ou <i>pTetO</i>	130
42	Représentation schématique de la titration de SopB dans un contexte d'incompatibilité	132
43	Test de stabilité des plasmides mini-F en <i>trans</i>	134
44	Répression de la transcription en <i>trans</i>	137
45	SopA-ADP est la meilleure forme fixatrice de <i>pSop</i>	139
46	Analyse de l'interaction de SopA avec le promoteur <i>sop</i> par résonance plasmon de surface	141
47	Représentation schématique du modèle <i>cis/trans</i>	147
48	Modèle de réaction diffusion	152

49	Modèle de « Pushing » avec une dépolymérisation hors du complexe de partition	154
50	Modèle de « Pulling » avec une dépolymérisation hors du complexe de partition	155
51	Modèle de « Pushing » avec une dépolymérisation au niveau du complexe de partition	156
52	Modèle de « Pulling » avec une dépolymérisation au niveau du complexe de partition	158

Liste des tableaux

1	Liste des mutations réalisées sur certains motif arginines « finger » bactérien	109
2	Test de stabilité des plasmides mini-F portant un locus <i>so- pABC</i>	128
3	Test d'incompatibilité des plasmides mini-F portant un locus <i>sopABC</i> avec un plasmide portant <i>sopC</i>	130
4	Tableau des plasmides utilisés	167
5	Tableau des souches utilisées	168
6	Tableau des oligonucléotides utilisés	169

Table des matières

Remerciements	iii
Résumé	v
Abstract	vii
Abréviations	ix
Table des figures	xi
Liste des tableaux	xiii
Table des matières	xv
I Introduction	1
1 Génome bactérien	5
1.A La composition du génome bactérien	5
1.A.1 Les chromosomes	5
1.A.2 Les plasmides	7
1.A.3 Les bactéries multichromosomiques	8
1.B Organisation du génome bactérien	9
1.C La ségrégation des chromosomes	10
1.D Le maintien des plasmides	14
1.D.1 Le contrôle de la réplication	15
1.D.1.a Le contrôle par les itérons	15
1.D.1.b Le contrôle par un ARN antisens	17
1.D.2 La ségrégation des plasmides	19
2 Les systèmes de partition	23
2.A Les acteurs de la partition plasmidique	23
2.B Les systèmes de partition de type I	25
2.B.1 Les systèmes de partition chromosomique	26
2.B.1.a <i>Bacillus subtilis</i>	27
2.B.1.b <i>Caulobacter crescentus</i>	28
2.B.1.c <i>Streptomyces coelicolor</i>	28

2.B.1.d	<i>Pseudomonas putida</i>	28
2.B.1.e	Conclusion sur les systèmes de partition chromosomique	29
2.B.2	Le système <i>parABS</i> des plasmides P1 et F	30
2.B.2.a	Les sites centromériques <i>parS</i>	30
2.B.2.b	Les propriétés physiques des protéines ParB	33
2.B.2.c	Les propriétés physiques de ParA	38
2.C	Les systèmes de partition de type II	44
2.C.1	Le système <i>parMRC</i> du plasmide R1	44
2.C.2	Structure des complexes ParR-centromère	44
2.C.3	Structures des protéines et filaments de ParM	46
3	Mécanismes moléculaires des système de partition de type I	51
3.A	Le rôle des protéines de liaison au centromère et des centromères dans la partition	51
3.A.1	La topologie du complexe de partition	51
3.A.2	L'étalement de ParB sur l'ADN	53
3.A.3	L'appariement des plasmides	55
3.B	Les ATPases ParA : moteurs de la partition	56
3.B.1	L'activité ATPase	56
3.B.2	L'autorégulation des opérons <i>par</i> et <i>sop</i>	57
3.B.3	Les protéines ParA interagissent avec le complexe de partition	61
3.B.4	Le comportement dynamique de ParA	62
3.B.4.a	L'oscillation de ParA	66
3.B.4.b	Les polymères de ParA	68
3.B.4.c	Le rôle de l'activité ATPase dans la partition	76
II	Résultats	77
1	La régulation de la polymérisation de SopA	81
1.A	Présentation de l'article : « Polymerization of SopA partition ATPase : regulation by DNA binding and SopB »	82
1.B	Caractérisation des filaments de SopA en présence du complexe de partition	97
1.B.1	SopA forme des fibres en présence du complexe de partition	99
1.B.2	Les fibres de SopA en absence du complexe de partition	99
1.B.3	Discussion	101

2	Régulation de l'activité ATPase de SopA	105
2.A	Présentation de l'article : « Dual role of DNA in regulating ATP hydrolysis by the SopA partition protein »	110
2.B	Discussion supplémentaire	123
3	Le rôle de la stimulation de l'activité ATPase de SopA <i>in vivo</i>	127
3.A	Le rôle de la stimulation de l'activité ATPase dans la partition	129
3.B	Le rôle de la stimulation de l'activité ATPase dans la régulation de l'opéron <i>sopAB</i>	138
3.C	Discussion et perspectives	142
III	Conclusion	149
IV	Matériels et méthodes	161
	Bibliographie	171

Première partie

Introduction

La transmission de l'information génétique contenue dans l'ADN est essentielle pour toutes cellules vivantes. Celle-ci est assurée par deux processus majeurs : la réplication qui permet la reproduction du génome en deux copies, et la répartition des deux copies du génome dans les cellules filles avant la division cellulaire. Le processus dédié à cette dernière fonction, s'appelle la mitose chez les eucaryotes et la partition chez les procaryotes. Les procaryotes, entendus ici comme majoritairement les bactéries, paraissent différents au niveau du matériel génétique. Contrairement au génome eucaryote, composé de plusieurs chromosomes logés dans un noyau et donc séparés du cytoplasme par une couche membranaire, le génome procaryote est typiquement composé d'un seul chromosome en contact direct avec le cytoplasme. Le maintien du génome procaryote présente des différences avec celui des eucaryotes. Par exemple, la réplication des chromosomes eucaryotes s'initie à de multiples origines et celle des procaryotes à une seule. La réplication et la mitose sont deux phases distinctes du cycle cellulaire eucaryote, alors que chez les procaryotes la partition commence peu après l'initiation de la réplication et continue tout au long de la réplication. En général, la microscopie suffit pour caractériser la mitose, mais la petite taille des bactéries impose d'autres approches.

Bien que les fonctions nécessaires pour la vie bactérienne soient fournies par le chromosome, un supplément qui donne aux bactéries une capacité de supporter des changements environnementaux est souvent apporté par de petites molécules d'ADN répliquatives, les plasmides. Tout comme les chromosomes, les plasmides assurent leur stabilité par la partition. Grâce à leur dispensabilité, leur petite taille et leur facilité de manipulation, les plasmides sont depuis longtemps des modèles privilégiés pour les études de la partition. C'est dans le but d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes moléculaires de la partition plasmidique, par des approches biochimiques et génétiques, et sur le rôle d'une ATPase impliquée dans la partition d'un plasmide que s'inscrivent mes travaux de thèse. Pour une meilleure appréciation des résultats de mes recherches, je présenterai d'abord les relations de la partition plasmidique avec celle des chromosomes et le cycle cellulaire. Puis je m'intéresserai à la description des éléments impliqués dans la partition plasmidique et ensuite aux approches *in vivo* et *in vitro* qui ont informé et encadré mon projet. Les résultats obtenus seront présentés dans la deuxième partie et seront ensuite discutés.

Chapitre 1

Génome bactérien

1.A La composition du génome bactérien

La grande majorité des bactéries possède un seul chromosome ainsi qu'un ou plusieurs éléments extra-chromosomiques appelés plasmides. Ces éléments définissent le génome de la bactérie et doivent être maintenus au cours des générations.

1.A.1 Les chromosomes

Les chromosomes sont en général circulaires, bien que plusieurs bactéries aient été mises en évidence pour la linéarité de leur chromosome (pour revue, [Casjens 1998](#)). Les chromosomes possèdent des tailles variables pouvant aller de 160 kilobases (kb) pour le chromosome de *Carsonella ruddii* à 13 mégabases (Mb) pour le chromosome de *Sorangium cellulosum*. La taille du génome peut refléter le mode de vie des bactéries. Les bactéries possédant de petits chromosomes sont souvent des bactéries symbiotiques, endosymbiotes d'insectes, ou des parasites obligatoires. Les bactéries à grand génome sont des bactéries « généralistes », avec des métabolismes complexes ou des bactéries possédant parfois des étapes de développement complexe comme la sporulation ou la formation de mycélium. Un chromosome caractéristique est illustré par l'un des chromosomes le plus étudié, celui d'*Escherichia coli*. Le chromosome d'*E. coli* est une molécule d'ADN circulaire d'environ 4,6 Mb. Il possède plus de 4000 gènes codant soit des protéines, soit des ARNs non traduits : les ARNs de transferts, les ARNs ribosomiaux et les petits ARNs. Chez les autres bactéries dont le génome a été séquencé, la densité de gène est semblable.

Les chromosomes sont autonomes pour leur réplication qui s'initie à une seule origine chromosomique appelée *oriC*. La réplication est bidirectionnelle et définit deux bras de réplication appelés réplichores (Figure 1). La composition en base du chromosome est biaisée selon les deux réplichores ([Blattner et al., 1997](#)) d'*oriC*

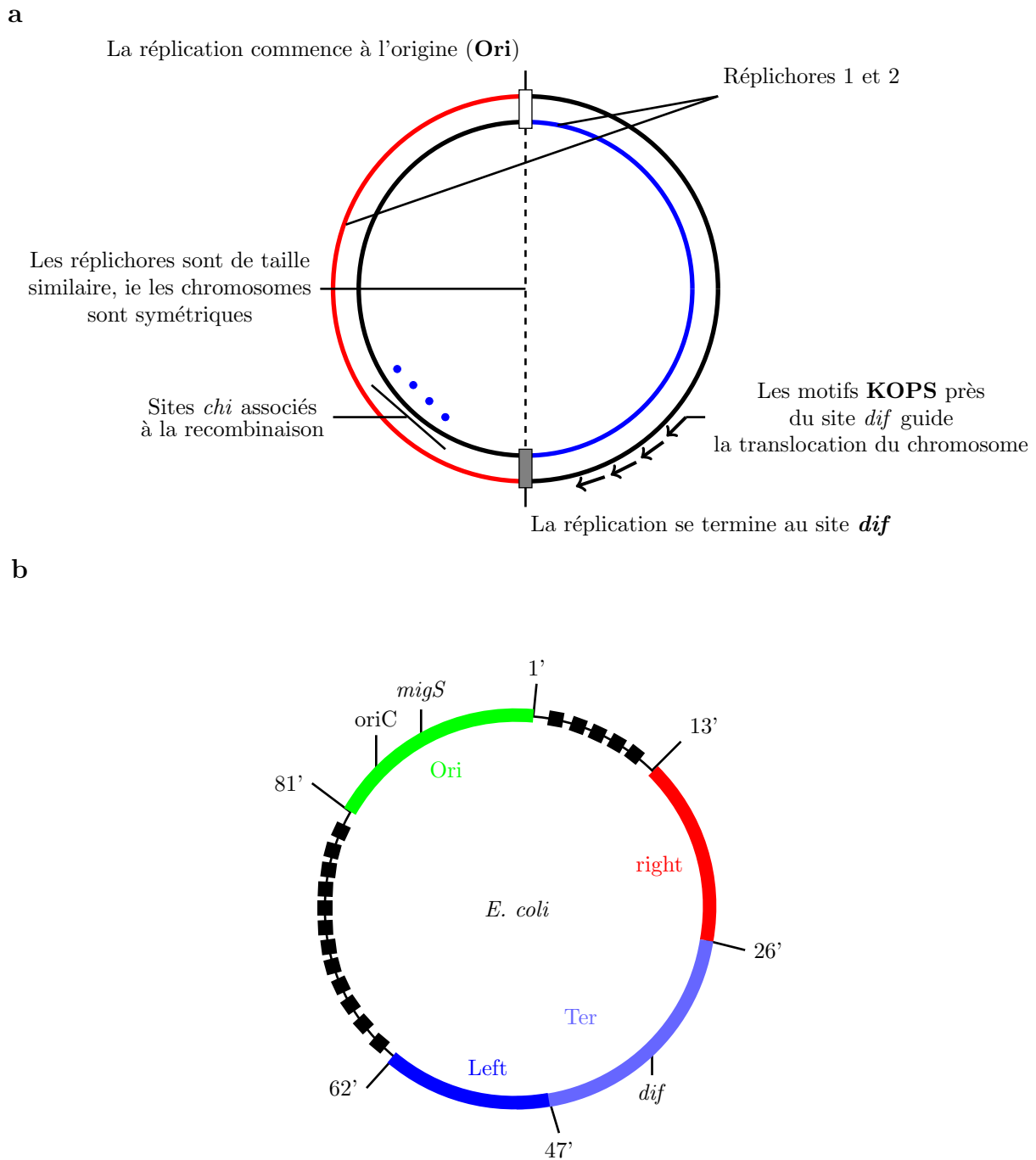


Figure 1 – L'organisation du génome d'*Escherichia coli*

A) Représentation schématique des réplichores et **B)** des macrodomaines du chromosome. En **B** les barres colorées représentent les différents macrodomaines et les barres noires représentent les régions non structurées. L'origine de réplication est indiquée, ainsi que le site *dif*, où convergent les deux réplichores du chromosome. (D'après Rocha 2008 et Valens et al. 2004.)

vers le terminus (*ter*). Ce biais concerne aussi plusieurs motifs d'oligonucléotides qui ont des fonctions spécifiques selon les deux réplichoires et s'inverse aux bornes des sites *oriC* et *ter* (Lobry and Louarn, 2003; Salzberg et al., 1998) (Figure 1a). Par exemple chez *E. coli*, on peut citer les séquences Chi de huit paires de bases impliquées dans la recombinaison homologue grâce à l'action de RecBCD-RecA ; ou encore les séquences KOPS de huit paires de bases qui orientent l'ADN translocase FtsK vers le site *ter* (Bigot et al., 2005). La réplication est en phase avec le cycle cellulaire et est initiée une fois par cycle. Cette initiation est simultanée pour toutes les origines chromosomiques présentes dans la cellule (Skarstad et al., 1986). La réplication s'initie en un seul point, donc les régions autour d'*oriC* sont déjà répliquées alors que les régions proches du terminus ne le sont pas encore. De ce fait, les loci proches de l'origine sont plus abondants en nombre de copies que ceux proches du terminus de réplication. Cette différence et la présence de loci en multicopie sont plus prononcées quand le temps de réplication du chromosome est supérieur au temps de doublement de la cellule. Lors d'une croissance rapide, en milieu riche, la bactérie initie des cycles réplicatifs qui s'achèvent au cours de la génération suivante (Cooper and Helmstetter, 1968). Il peut donc y avoir quatre à huit copies des régions origines pour une seule copie de la région terminus.

1.A.2 Les plasmides

Le terme plasmide proposé en 1952 par Joshua Lederberg s'applique aux éléments génétiques capables d'exister sous une forme physiquement séparée du chromosome. Ils sont pour la plupart non-essentiels à la survie des bactéries et ils sont souvent porteurs de déterminants génétiques qui offrent un avantage sélectif aux bactéries hôtes dans un environnement particulier. Les plasmides sont typiquement des molécules d'ADN circulaires de petite taille, mais certains plasmides peuvent être linéaires. La gamme de taille chez les plasmides est extrêmement large pouvant aller de quelques kb à plusieurs Mb. Les plasmides régulent eux-mêmes l'initiation de leur réplication qui n'est pas en phase avec le cycle cellulaire. Ils portent des régions *rep* leur assurant la capacité de se répliquer. Cette région comprend au moins une séquence *ori* d'initiation de la réplication et un ou plusieurs gènes *rep* codant des protéines qui agissent sur le site *ori* et permettent le démarrage de la réplication. La réplication elle-même est ensuite effectuée par l'ADN polymérase codée par l'hôte. Comme pour les chromosomes, la réplication est initiée à une origine unique, mais peut être unidirectionnelle ou bidirectionnelle. Il existe deux types majeurs de plasmides :

- les plasmides à bas nombre de copies, comme le plasmide F ou P1 d'*E. coli*, présent, suivant le milieu de croissance, à une à cinq copies par cellule
- et les plasmides à haut nombre de copies, comme le plasmide ColE1 présent

de vingt à trente copies par cellule.

La diffusion passive des plasmides dans le cytoplasme engendre une ségrégation aléatoire lors de la division cellulaire. Le plasmide pSC101 qui est de l'ordre d'une dizaine de copies par chromosome, peut se maintenir de façon passive dans les bactéries au cours des générations. La probabilité d'apparition d'une cellule sans plasmide par division cellulaire suit la formule suivante : $P_0 = 2^{1-n}$, où n est le nombre de copies du plasmide avant la division cellulaire. Pour pSC101, la perte d'un plasmide est prédite à une fois tous les $5 \cdot 10^2$ divisions, ce qui est négligeable. En revanche, un plasmide présent à cinq copies par cellule va être perdu une fois toutes les seize générations et un plasmide présent à deux copies par cellule, toutes les deux générations. Les plasmides à bas nombre de copies tels que le plasmide F, ne peuvent pas se maintenir dans les cellules par diffusion passive. Ces plasmides à bas nombre de copies possèdent donc un locus codant pour un système actif de partition nécessaire pour leur maintien. Ce système de partition sera décrit ultérieurement.

1.A.3 Les bactéries multichromosomiques

De manière exceptionnelle, le génome de certaines espèces comprend d'autres grands réplicons, donnant un état multichromosomique aux bactéries. C'est le cas, par exemple d'*Agrobacterium tumefaciens*, de *Vibrio cholerae* ou encore de *Burkholderia cenocepacia* qui possèdent deux ou trois chromosomes. Ces grands réplicons sont distingués selon leur ressemblance au chromosome des bactéries monochromosomiques. On définit alors comme chromosome principal la molécule la plus grande, dont l'origine de répllication est similaire à celle connue pour les bactéries monochromosomiques et qui porte les gènes de ménage de la cellule, notamment les gènes codant les ARNs ribosomiques. Tous les autres réplicons à bas nombre de copies maintenus dans la cellule quelles que soient les conditions sont définis comme des chromosomes secondaires. Il existe donc deux types de bactéries, celles possédant un génome multipartite et celles possédant un génome constitué d'un seul chromosome.

Chaque réplicon constituant le génome de la bactérie est un substrat pour la partition. Le génome n'est pas contenu dans un noyau, mais n'est pas complètement dispersé dans la cellule. Il possède une organisation physique particulière qui contribue sans doute à son maintien au cours des générations. Cette organisation est décrite dans la section suivante.

1.B Organisation du génome bactérien

La taille du génome bactérien est l'une des contraintes majeures rencontrées lors du processus de ségrégation. Un chromosome bactérien de plusieurs Mb correspond à un ruban d'ADN d'une longueur d'environ 1 mm qui est donc bien supérieur aux quelques micromètres de la cellule qui le contient. L'ADN est donc nécessairement compacté de l'ordre de mille fois pour pouvoir être contenu dans une cellule bactérienne. Au sein de la cellule, l'ADN est condensé en une à deux masses nucléoprotéiques appelées nucléoïdes. Suivant les conditions de croissance, le nucléoïde change d'aspect microscopique (forme O, forme C, forme bilobée, forme toroïdale ; pour revue [Zimmerman 2006](#)) suggérant un état dynamique de l'ADN, soumis à des forces de compaction et d'expansion. Le surenroulement négatif de l'ADN joue un rôle majeur dans la compaction de l'ADN. Il est crucial pour la survie de la bactérie car il contrôle les interactions nucléoprotéiques, l'activité de certains promoteurs, et le métabolisme de l'ADN en général. Il existe plusieurs types de protéines associées à l'ADN qui agissent dans le maintien et les modifications de sa condensation et de sa topologie.

Les topoisomérases comme la gyrase par exemple maintiennent la super-hélicité négative de l'ADN en enlevant les supertours positifs générés au cours de la réplication et la transcription (pour revue [Wang 2002](#)).

Une large variété de petites protéines basiques non essentielles, les NAPs, ont une affinité pour l'ADN. Il existe plusieurs NAPs (HU, H-NS, IHF, FIS) dont le niveau de production peut varier fortement en fonction des phases de croissance ([Thanbichler et al., 2005](#)). Un rôle commun a été montré dans la compaction à l'échelle locale du chromosome et la modulation de l'expression des gènes dont les régions promotrices sont sensibles à la topologie de l'ADN ([Hommais et al., 2001](#); [Wagner, 2000](#)).

Des protéines de plus haut poids moléculaire que les NAPs sont aussi associées au nucléoïde. Ces protéines initialement identifiées chez les eucaryotes, sont nommées SMCs (« structural maintenance of chromosomes »). Chez les eucaryotes, plusieurs familles de SMCs sont impliquées dans de nombreux processus comme la cohésion des chromatides soeurs, la condensation des chromosomes avant la mitose et la recombinaison (pour revue [Nasmyth and Haering 2005](#)). Les SMCs sont également très répandues dans le monde bactériens. Chez *Bacillus subtilis* le complexe SMC (BsSMC) est nécessaire pour la condensation du chromosome et la ségrégation de l'ADN ([Britton et al., 1998](#); [Hirano and Hirano, 2004](#); [Mascarenhas et al., 2002](#)). *E. coli* exprime des complexes SMCs divergeants, appelés MukB, qui ont des propriétés biochimiques et phénotypiques équivalentes au complexe SMC ([Danilova et al., 2007](#); [Niki et al., 1992](#)). MukB et BsSMC facilitent l'organisation du chromosome en s'as-

sociant aux régions origines nouvellement répliquées (Danilova et al., 2007; Sullivan et al., 2009). Dans un mutant *mukB* ces régions origines d'*E. coli* perdent leur localisation correcte et un défaut de ségrégation est observé (Danilova et al., 2007). Les protéines MukB et SMCs sont donc impliquées dans la condensation et la ségrégation du chromosome. Cependant la présence de ces condensases n'est pas essentielle à la survie de la bactérie.

En plus d'être organisé au niveau local, le chromosome bactérien paraît structuré à un niveau supérieur. Cette organisation à grande échelle du chromosome, mise en évidence chez *E. coli*, est caractérisée par les macrodomaines (Niki et al., 2000). Les macrodomaines (Figure 1b) sont des loci qui ont été définis selon deux propriétés : leur localisation intracellulaire spécifique et leur faible fréquence de rencontre au cours du cycle cellulaire (Niki et al., 2000; Valens et al., 2004). Quatre macrodomaines et deux régions non structurées ont été recensés. Le macrodomaine Ori, d'environ 1 Mb, contient le site d'origine de réplication *oriC* et le site *migS* potentiellement impliqué dans la migration du chromosome (Yamaichi and Niki, 2004). Le macrodomaine Ter d'environ 1 Mb est centré autour du site *dif* impliqué dans la résolution des dimères de chromosomes (pour revue Lesterlin et al. 2004). Les deux autres macrodomaines appelés « Right » et « Left » d'environ 0,7 Mb ont été définis de chaque côté du domaine Ter (Valens et al., 2004). Les deux régions non structurées de 0,6 et 0,9 Mb sont situées de chaque côté du macrodomaine Ori. Ces régions sont capables d'interagir avec leurs macrodomaines flanquant. Le suivi des macrodomaines en microscopie à fluorescence montre un isolement physique dans la cellule (Espeli et al., 2008).

Ce niveau d'organisation suggère l'existence de déterminants moléculaires caractéristiques de chaque macrodomaine. Cette hypothèse a été validée pour le domaine Ter dans lequel 21 séquences identiques, appelées *matS*, ont été découvertes. Elles correspondent au site de fixation de la protéine MatP au chromosome, qui est nécessaire à la localisation correcte de la région Ter au cours du cycle cellulaire (Mercier et al., 2008). Cette organisation du chromosome orchestrerait les mouvements du chromosome et serait impliquée dans sa ségrégation.

1.C La ségrégation des chromosomes

Pour que la partition fonctionne efficacement, il faut qu'elle soit capable de gérer le déplacement des masses d'ADN importantes et denses, et qu'elle s'active en correspondance avec le cycle cellulaire. Initialement Jacob et Brenner (Jacob and Brenner, 1963) proposèrent que les chromosomes nouvellement répliqués seraient attachés à la membrane cytoplasmique et que la croissance de la cellule contribue-

rait à leur séparation et donc à leur ségrégation. Cependant la découverte de loci codant des systèmes de partition actifs chez les plasmides à bas nombre de copies (Austin and Wierzbicki, 1983; Ogura and Hiraga, 1983) suggéra un mécanisme actif pour les chromosomes. De plus la vitesse de déplacement de l'origine est de l'ordre de 0,1-0,3 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Viollier et al., 2004; Webb et al., 1998) ce qui excède le taux d'élongation cellulaire, et confirme donc l'existence d'un mécanisme qui ségrège activement l'ADN nouvellement synthétisé. De manière intéressante les gènes codant pour des homologues de ces systèmes de partition plasmidiques ont été identifiés sur presque tous les chromosomes bactériens séquencés jusqu'à présent à l'exception de quelques bactéries comme *E. coli*. En effet, pour les plasmides à bas nombre de copies, des mécanismes basés sur la polymérisation ont été mis en évidence. Ces plasmides possèdent un système de partition qui code deux protéines, une ATPase et une protéine de liaison à l'ADN, impliquées dans la partition des plasmides. Ces systèmes de partition seront détaillés ultérieurement. Il a été montré que ces ATPases sont capables de former des filaments *in vivo* et *in vitro* (Barillà et al., 2005; Bouet et al., 2007; Ebersbach et al., 2006; Lim et al., 2005; Moller-Jensen et al., 2003; Van Den Ent et al., 2002). Parmi ces ATPases, ParM codée par le plasmide R1 d'*E. coli*, qui est aussi un homologue des actines, est capable de polymériser *in vivo* et de pousser séparément chaque copie du plasmide au pôle de la cellule (Moller-Jensen et al., 2003; Van Den Ent et al., 2002). Le mécanisme d'action de ces protéines reste à définir, mais il a été démontré que la protéine de liaison à l'ADN interagit avec des sites de fixation conservés, appelés *parS*, qui sont régulièrement organisés en cluster dans la région proximale de l'origine des chromosomes (Bartosik et al., 2004; Easter and Gober, 2002; Jakimowicz et al., 2002; Lee et al., 2006; Lin and Grossman, 1998). De plus, ces deux protéines sont essentielles pour la ségrégation correcte des chromosomes. A l'exception de *Caulobacter crescentus* (Mohl and Gober, 1997), la délétion des gènes codant ces deux protéines n'est pas létale pour les bactéries mais induit généralement une fréquence importante de cellules anucléées (Godfrin-Estevenson et al., 2002; Ireton et al., 1994; Kim et al., 2000; Lewis et al., 2002). Ceci suggère que plus d'un système peut être responsable de la ségrégation de l'ADN chez les bactéries.

La ségrégation du chromosome a été principalement étudiée chez les bactéries, *E. coli* et *B. subtilis*. Ces bactéries portent un chromosome unique et circulaire. Des analyses de FISH (fluorescence *in situ* hybridization) et de FROS (fluorescent repressor-operator system) révèlent que la ségrégation de l'ADN suit un schéma commun chez ces bactéries (Figure 2). Ces analyses ont montré que l'origine et le terminus de réplication ont toujours une localisation bien définie dans les cellules nouvellement divisées. Le terminus est orienté vers l'un des pôles de la cellule et

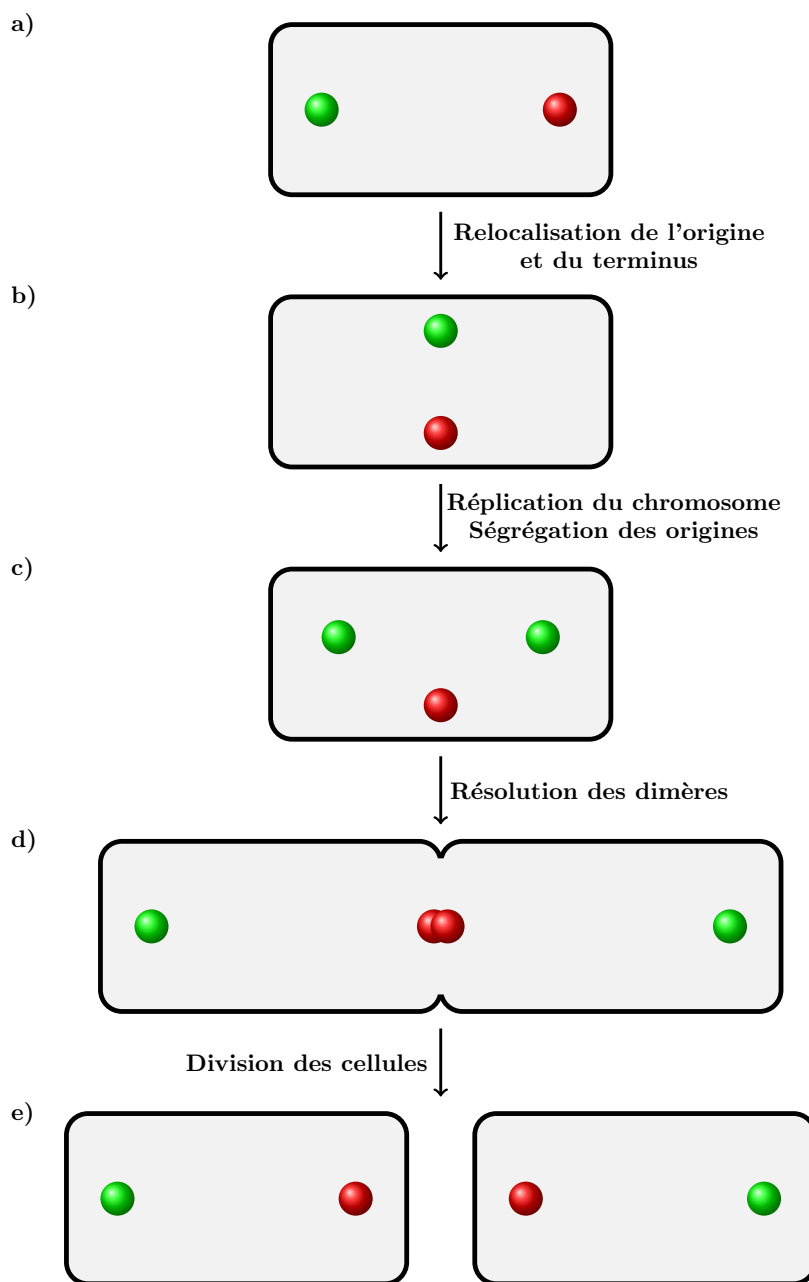


Figure 2 – Modèle de ségrégation des chromosomes de *Bacillus Subtilis* et d'*Escherichia coli* en croissance lente

a) Dans les cellules nouvellement répliquées, la région origine (rond vert) et la région terminus (rond rouge) apparaissent aux pôles opposés de la cellule. b) A l'initiation de la réplication, le chromosome s'oriente et positionne l'origine et le terminus au centre de la cellule. c) Les origines répliquées migrent aux pôles opposés de la cellule, alors que l'ADN non répliqué reste au centre de la cellule. d) La réplication se termine au niveau du terminus et les dimères de chromosomes sont résolus en monomères. e) Finalement les cellules se divisent, les régions terminus se retrouvent aux nouveaux pôles des cellules alors que les régions origines se retrouvent aux anciens pôles de la cellule.

l'origine est positionnée au pôle opposé de la cellule (Gordon et al., 1997; Li et al., 2002; Niki and Hiraga, 1998; Wang et al., 2005; Webb et al., 1997). Dans les nouvelles cellules, l'origine et le terminus se relocalisent au centre de la cellule. Après l'initiation de la réplication, les origines nouvellement répliquées migrent séparément aux positions $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ de la cellule alors que le terminus reste au centre de la cellule. La dernière étape de la partition correspond à la duplication et à la séparation des terminus qui se fait au niveau du septum de division. Si des dimères de chromosomes ont été formés au cours de l'étape de réplication, ils doivent être résolus en monomère avant la division cellulaire. Un mécanisme de recombinaison site-spécifique XerCD/*dif* est dédié à cette fonction (pour revue Lesterlin et al. 2004). Ce profil de localisation n'est pas généralisé pour toutes les bactéries. En effet, chez *Caulobacter crescentus* l'origine de réplication est positionnée à un pôle, et après réplication, l'origine nouvellement répliquée migre rapidement (plus rapidement que le reste du chromosome) à l'autre pôle de la cellule (Viollier et al., 2004). Les autres loci chromosomiques, nouvellement répliqués, sont ségrégués et positionnés en suivant l'ordre de leur réplication. Chez *V. cholerae* qui possède deux chromosomes, les origines de chaque chromosome ont une localisation cellulaire distincte. L'origine du chromosome I a une localisation similaire au chromosome de *C. crescentus*, alors que l'origine du chromosome II a une localisation similaire au chromosome d'*E. coli* et de *B. subtilis*.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la dynamique du chromosome. L'un de ces mécanismes pouvant fournir la force générant la ségrégation des chromosomes est la transcription (Dworkin and Losick, 2002; Kruse et al., 2006). En effet, l'ARN polymérase est une protéine motrice puissante et abondante (Gelles and Landick, 1998; Wang et al., 1998) et semble être largement immobilisée dans la cellule. Ainsi au lieu de migrer le long de l'ADN, l'ARN polymérase pourrait le déplacer au cours de la synthèse de l'ARNm (Kruse et al., 2006). En accord avec cette hypothèse, il a été montré que l'inhibition de la transcription empêche la ségrégation correcte de l'ADN chez *B. subtilis* (Dworkin and Losick, 2002) et *E. coli* (Kruse et al., 2006). La réplication, la traduction co-transcriptionnelle et la translocation des protéines membranaires pourraient être également des forces conductrices de la ségrégation des chromosomes (Lemon and Grossman, 1998; Wol-dringh, 2002). Cependant, tous ces mécanismes ne peuvent expliquer la localisation spatio-temporelle et la migration bipolaire des origines de réplication. Les bactéries doivent donc posséder un mécanisme qui, par analogie à la machinerie de ségrégation mitotique des cellules eucaryotes, reconnaît et positionne activement les régions origines dupliquées. Ces dernières seraient alors le point de départ qui guiderait les segments d'ADN dans les compartiments des cellules filles naissantes.

Les éléments du cytosquelette découverts récemment chez les bactéries sont considérés comme des candidats potentiels pour la machinerie de ségrégation. Une étude par analyse de séquence a montré que des actines eucaryotes possèdent des résidus conservés communs avec plusieurs protéines bactériennes, comme FtsA et MreB, importants pour les étapes du cycle cellulaire (Bork et al., 1992). Un rôle central dans la partition des chromosomes a été attribué à MreB. Cette protéine est retrouvée chez toutes les bactéries non sphériques où elle forme des structures en spirales (Jones et al., 2001). Elle est impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires, tels que la forme des cellules, la localisation de protéines et l'établissement de la polarité des cellules (Gitai et al., 2004; Shih et al., 2005; Wagner et al., 2005). L'inactivation ou la surexpression de MreB affecte sévèrement la localisation des régions origines et la ségrégation de l'ADN (Gitai et al., 2004; Kruse et al., 2003; Soufo and Graumann, 2003). Cependant, un rôle direct de MreB dans le processus de ségrégation est récemment remis en cause car un triple mutant des trois actines homologues MreB, MreBH et Mbl de *B. subtilis*, n'entraîne pas de défaut de ségrégation du chromosome (Schirner and Errington, 2009).

La partition des chromosomes bactériens est un mécanisme complexe et reste encore largement incomprise aujourd'hui. Il semble que plusieurs partenaires interviennent tant sur l'organisation que sur la dynamique des chromosomes pour permettre leur ségrégation correcte. Comme énoncé ci-dessus, les plasmides à bas nombre de copies possèdent des systèmes de partition actifs, dédiés à leur ségrégation. Leur étude représente un grand intérêt pour la compréhension de la ségrégation des réplicons bactériens.

1.D Le maintien des plasmides

Les plasmides possèdent des systèmes complémentaires pour se maintenir au cours des générations. Les plasmides à bas nombre de copies qui ne peuvent pas se maintenir dans les cellules par diffusion passive, possèdent en plus des systèmes actifs de partition nécessaires à leur maintien (abordé dans le chapitre 2). Tous les plasmides sont soumis au contrôle du nombre de copies (abordé dans le chapitre 1.D.1) et du nombre d'unité de ségrégation. Pendant, ou après la répllication des molécules d'ADN, il peut y avoir la génération de dimères et éventuellement de multimères suite à un événement de recombinaison homologue entre les différentes copies du réplicon. Ce phénomène réduit le nombre d'unité de ségrégation, ce qui devient une cause d'instabilité (Sternberg and Hamilton, 1981; Summers et al., 1993; Summers and Sherratt, 1984). Pour résoudre ce problème, la plupart des réplicons

utilise des systèmes de recombinaison sites spécifiques qui convertissent les dimères en monomères. Malgré l'ensemble des mécanismes codés par les réplicons afin d'assurer leur transmission au cours des générations, des cellules ayant perdu le plasmide d'intérêt sont générées dans la population. Un dernier système a été mis en évidence comme impliqué dans la stabilité apparente des plasmides : le système toxine anti-toxine (pour revue Gerdes et al. 1997, 2000). Ce module ne prévient pas la perte du plasmide, mais contribue au maintien du plasmide dans une population en éliminant les ségréants qui en sont dépourvus après cytokinèse. Ce dernier système ne sera pas détaillé ici.

1.D.1 Le contrôle de la réplication

Les plasmides initient leur réplication indépendamment du cycle cellulaire. Le nombre de copies par cellule est un paramètre caractéristique de chaque plasmide, qui peut néanmoins varier suivant la souche hôte, les conditions de croissance et la phase de croissance. Un faible taux de réplication induirait une perte du plasmide, et au contraire un fort taux pourrait rapidement devenir un fardeau pour le métabolisme de l'hôte. Des systèmes intrinsèques du contrôle de la réplication du plasmide permettent un maintien à un nombre de molécules par chromosome relativement constant et caractéristique d'un plasmide donné dans des conditions de croissance définies. Les stratégies développées par les plasmides dépendent de deux catégories d'inhibiteurs de l'initiation de la réplication : la régulation du niveau intracellulaire de la protéine Rep par des séquences répétées appelées itérons (plasmide F, plasmide P1, pour revue Chatteraj 2000), et l'inhibition de la traduction d'un ARN essentiel à l'initiation de la réplication via un ARN antisens (ColE1, R1, pour revue del Solar and Espinosa 2000). Ces modes de régulation ont été principalement étudiés chez les plasmides possédant un mode de réplication de type θ (Figure 3). Les deux autres modèles de la réplication sont la réplication par cercle roulant et la réplication par déplacement de brin (pour revue del Solar et al. 1998).

1.D.1.a Le contrôle par les itérons

Les itérons sont essentiels pour la réplication du plasmide mais aussi pour le contrôle du nombre de copie. Deux modèles ont été proposés pour expliquer le contrôle de la régulation par les itérons. Le premier modèle est basé sur l'observation de la réplication du plasmide F qui est inhibée lorsque les itérons de la région origine sont clonés sur un plasmide compatible (Tolun and Helinski, 1981). Des observations similaires ont été faites pour le plasmide P1, où il a été montré que l'inhibition de la réplication est proportionnelle au nombre d'itérons clonés

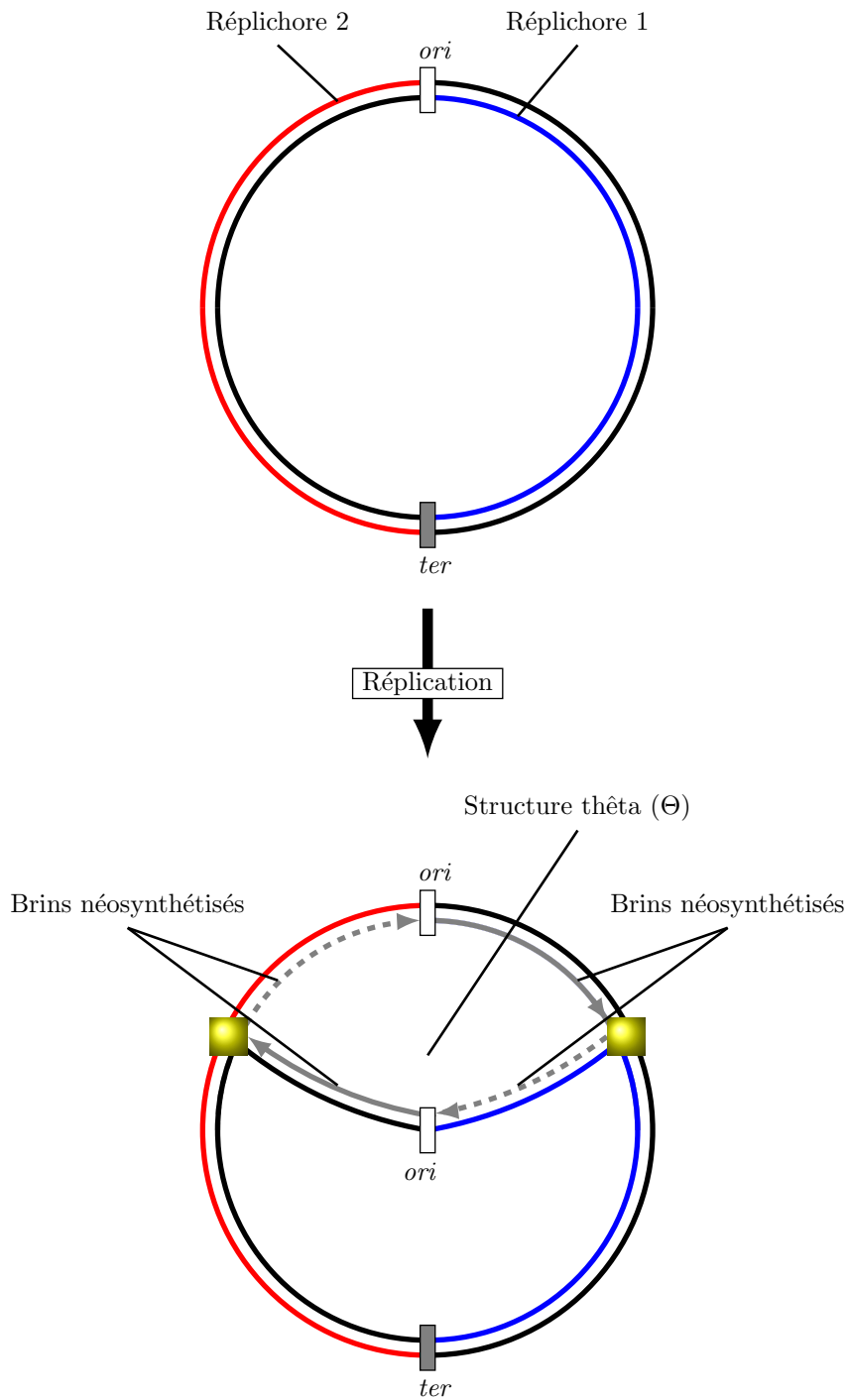


Figure 3 – La réplication bidirectionnelle par le mécanisme thêta

La réplication est initiée à partir du site unique *ori*. Les fourches de réplifications (carré jaune) progressent en sens opposé sur les deux réplichores. Pour chaque fourche de réplication, un brin précoce (flèches pleines grises) est produit en continu à partir d'une seule amorce et un brin retardé (flèches pointillées grises) est synthétisé sous forme de fragments discontinus (fragment d'Okasaki) qui sont ensuite reliés de façon covalente en un seul long fragment. La réplication s'achève dans la région *ter*.

(Pal and Chatteraj, 1988). Ces observations ont conduit à la formulation du modèle de titration (Tsutsui et al., 1983). Ce modèle propose que la protéine Rep est en concentration limitante pour l'initiation de la réplication, et que les itérons titrent les protéines Rep réduisant ainsi la fréquence d'initiation. Paradoxalement, les protéines Rep des plasmides possédant des itérons sont autorégulées. Ceci implique que la titration par les itérons pourrait conduire à la dérégulation du gène *rep* et par conséquent augmenter la fréquence d'initiation de la réplication. Pour compléter le modèle de titration, il a été proposé que l'autorégulation et l'initiation de la réplication soient gérées par différentes formes de la protéine Rep et donc la titration ne cause pas la dérégulation. Le cas du plasmide F (Figure 4) permet d'illustrer ce modèle. En effet, la forme native de la protéine Rep du plasmide F (RepE) est un homodimère inactif pour l'initiation de la réplication, mais active pour la répression de la transcription du gène *repE* (Ishiai et al., 1994). L'initiation de la réplication nécessite la conversion des dimères de RepE en monomères. RepE se fixe alors sur les itérons d'*ori2* afin d'initier la réplication. Le rôle de titration de RepE est assuré par la région *IncC* située en aval du gène *repE* et composée de plusieurs répétitions d'itérons.

Un modèle alternatif à celui de titration/autorégulation a été proposé suite à une étude réalisée sur le plasmide P1 par Chatteraj et collaborateurs (Chatteraj et al., 1988). Les auteurs ont remis en question l'effet de la titration en montrant que les protéines Rep du plasmide P1 (RepA) fixées aux itérons de *incA* sont toujours capables de réprimer le promoteur de RepA. Ce modèle se base sur la capacité des protéines RepA de se fixer à deux itérons simultanément, entraînant la formation de boucle d'ADN au sein de la même molécule (*cis*). Selon ce modèle, les protéines RepA fixées sur les itérons d'une origine vont aussi interagir avec des complexes similaires générés sur les autres origines. Par conséquent, les plasmides sont appariés par des interactions Rep-Rep causant un encombrement stérique des deux origines (*trans*). C'est le modèle de « handcuffing » (McEachern et al., 1989) qui peut donc s'effectuer en *cis* ou en *trans*. Dans ce cas, c'est la concentration en itérons, plus que le niveau d'expression de Rep, qui détermine la fréquence de réplication. Pour le plasmide F, il a été démontré que le contrôle du nombre de copies était compatible avec un couplage des mécanismes de titration et de « handcuffing » (Morrison and Chatteraj, 2004).

1.D.1.b Le contrôle par un ARN antisens

Le contrôle du nombre de copies des plasmides au moyen d'un ARN antisens est un système alternatif à celui impliquant des itérons. Ces ARN antisens sont complémentaires d'une région en 5' d'un transcrit cible essentiel à l'initiation de la

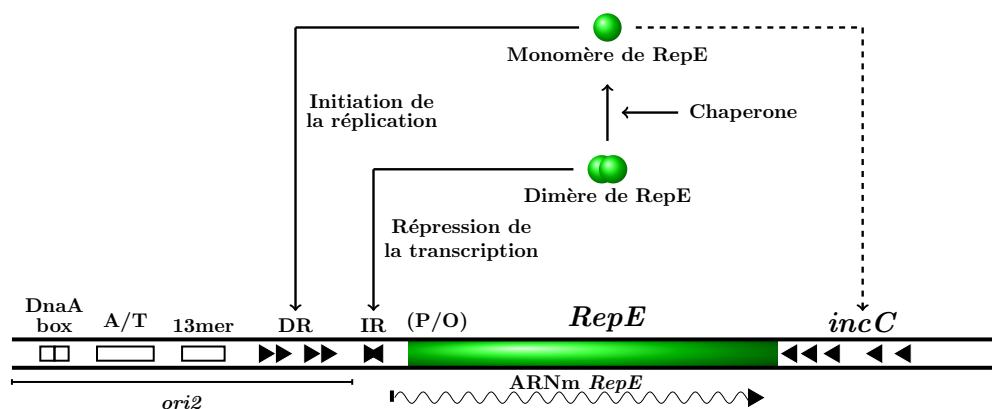


Figure 4 – Organisation de la région contenant l’origine de réplication du plasmide F

La partie *ori2* contient deux sites de fixation de DnaA, une région riche en AT, une séquence de 13 mer homologue à celle présente à la région origine du chromosome et quatre séquences répétées en orientation directe de 19pb (itérons) sur lesquelles RepE se fixe de façon spécifique. Le gène *repE* est localisé à proximité d’*ori2* et code pour la protéine de réplication RepE du plasmide F. Son expression est sous le contrôle de séquences répétées en orientation inverse, en amont du promoteur, sur lesquelles RepE peut se fixer. La région régulatrice, *incC*, est constituée de cinq séquences répétées en orientation directe qui partagent un consensus avec les itérons d’*ori2*. Les séquences répétées d’*incC* et les itérons d’*ori2* sont en orientation inverse. (D’après Uga et al. 1999.)

réplication (pRNA ou mRNA de rep) et sont appelés “countertranscribed RNAs” (ctRNAs). La régulation avec des ARNs antisens concerne en général des plasmides multicopies (ColE1,p15A). Cependant des plasmides à bas nombre de copies utilisent ce type de régulation et l'exemple du plasmide R1 est décrit ici (Figure 5). Le contrôle du nombre de copies de R1 est exercé au niveau de la synthèse des protéines Rep (RepA) qui est régulée par les gènes de contrôle du nombre de copies *copA* et *copB* (pour revue Nordström et al. 1984; Wagner and Simons 1994). Les produits de *copB* et de *copA* inhibent le gène *repA* respectivement au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. *copA* est le principal gène du contrôle du nombre de copies alors que *copB* possède un rôle accessoire. CopB réprime, sous sa forme dimérique, la transcription de *repA* en agissant sur son promoteur localisé en aval de *copB*. *copA* est transcrit à partir d'un promoteur constitutif et son produit est un ARN instable (une demi-vie de deux min), CopA, qui est complémentaire à la région « leader » (CopT) de l'ARNm de *repA*. L'hybridation de l'ARN CopA à sa cible CopT inhibe la synthèse de RepA en empêchant la traduction du peptide « leader », Tap qui est couplé à la traduction de RepA (Blomberg et al., 1992). L'efficacité de l'inhibition dépend de la stabilité du duplex CopA-CopT. Le clivage de ce duplex par la RNaseIII semble être une étape importante dans le contrôle de la synthèse de RepA (Blomberg et al., 1990).

En général, tous les modèles sur le contrôle de la réplication des plasmides peuvent expliquer comment la moyenne du nombre de copies des plasmides est maintenue dans une population en croissance et comment les fluctuations de cette moyenne sont corrigées. Cependant le maintien du nombre de copies des plasmides ne permet pas d'expliquer la stabilité des plasmides à bas nombre de copies dans les cellules filles. Ce mécanisme est géré par un système porté par le plasmide appelé système de partition, qui fait l'objet du paragraphe suivant.

1.D.2 La ségrégation des plasmides

Des études sur la localisation de l'ADN plasmidique donnent un aperçu sur les évènements de ségrégation des plasmides. Tout comme les chromosomes bactériens, les plasmides présentent une localisation dynamique très ordonnée qui souligne la présence d'un mécanisme actif impliqué dans la ségrégation des plasmides. Cette fonction est assurée par les systèmes de partition. Des expériences de microscopie à fluorescence ont permis de déterminer le positionnement des plasmides F et P1 dans les cellules, par une approche FISH (hybridation de sondes marquées complémentaires à la séquence du plasmide F) ou FROS (localisation de séquences *lacO* par l'expression de la protéine de fusion LacI-GFP)

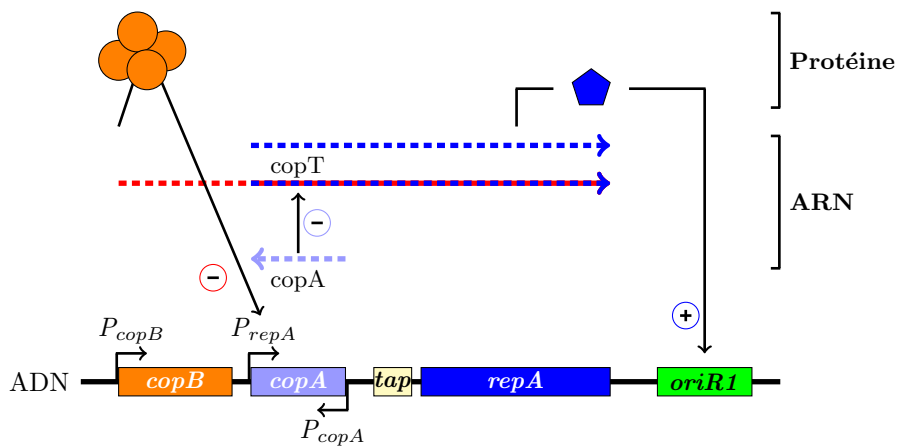


Figure 5 – **Contrôle de la répllication du plasmide R1 par ARN antisens**
 La protéine initiateur RepA peut être traduite à partir de deux transcrits (pointillés bleus : ARNm de *repA* ; pointillés bleus et rouges : ARNm de *copB* et de *repA*). Il existe deux voies de régulation de la synthèse de RepA : la répression du promoteur P_{repA} par la protéine CopB et l'inhibition de la traduction de l'ARNm de *repA* par l'ARN antisens *copA*. (D'après Nordström 2006.)

(Gordon et al., 1997; Niki and Hiraga, 1997). Les deux méthodes qui utilisent respectivement des cellules fixées et des cellules vivantes, donnent des résultats similaires concernant le nombre de foci et leur localisation pour les deux plasmides. En général, les petites cellules ont un seul focus au centre de la cellule, alors que les grandes cellules ont deux foci localisés aux positions $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ des cellules (Figure 6). Les cellules d'une longueur intermédiaire peuvent avoir un focus ou deux foci, ce qui suggère que la migration des plasmides n'est pas couplée à l'élongation de la cellule. La fréquence de cellules avec deux foci très proches est très faible, suggérant qu'une fois répliqués les plasmides sont directement déplacés vers les positions $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ de la cellule. Ils y sont maintenus jusqu'à la fin de la cytokinèse. Dans le cas du plasmide R1, le positionnement des copies du plasmide est légèrement différent (Jensen and Gerdes, 1999). Ils sont localisés au centre de la cellule ou, contrairement au plasmide F (Figure 6) et P1, proches des pôles de la cellule. La présence de tous les éléments du système de partition est essentielle pour la localisation des plasmides et leur absence conduit à une distribution aléatoire des plasmides dans les cellules (Jensen and Gerdes, 1999; Niki and Hiraga, 1997).

Ces résultats ont mis en évidence que la partition est une réaction de positionnement des plasmides à l'intérieur des cellules. Il faut assurer que les copies soient réparties avant la division cellulaire et les systèmes de partition sont responsables de cette fonction. Ce mécanisme semble indépendant du cycle cellulaire. Une fois la réplication terminée, les substrats de la partition vont être rapidement ségrégés. Il est clairement défini que les systèmes de partition plasmidique ont un rôle primordial dans la ségrégation des plasmides. Les éléments du système sont essentiels pour la partition et sont responsables de la localisation des plasmides au centre de la cellule ainsi que de leur ségrégation dans les cellules filles. Nous verrons dans le chapitre suivant que les systèmes de partition sont composés de trois éléments qui ont chacun des fonctions spécifiques et qui interagissent entre eux pour permettre la partition.

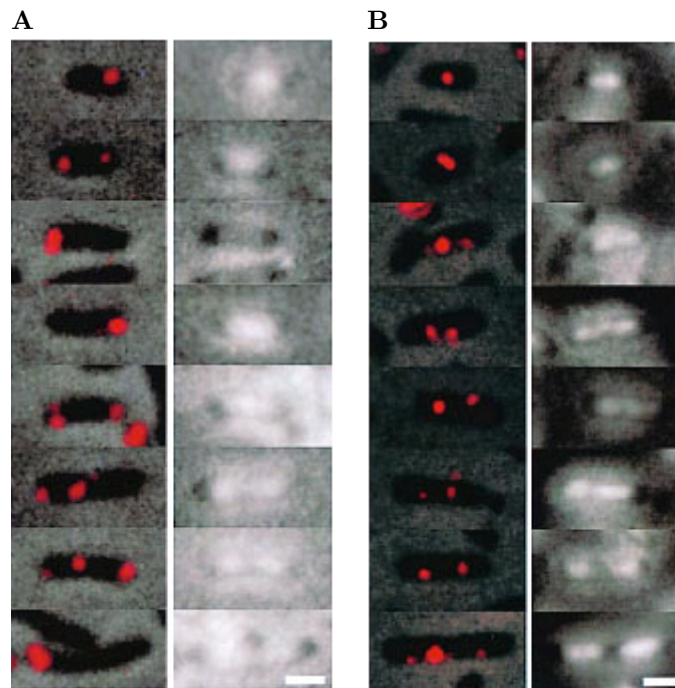


Figure 6 – Localisation intracellulaire du plasmide mini-F par hybridation *in situ* (FISH)

Le plasmide F (colonnes de gauches) est révélé grâce à une sonde portant le fluorochrome Cy3. Les nucléoïdes (colonnes de droites) sont marqués au DAPI. Dans les deux cas, les images sont combinées avec le contraste de phase.

(A) Les cellules portent un plasmides miniF *sopABC*⁺, (B) les cellules portent un plasmides miniF *sopABC*⁻. La barre d'échelle indique 1 μm . (D'après Niki and Hiraga 1997.)

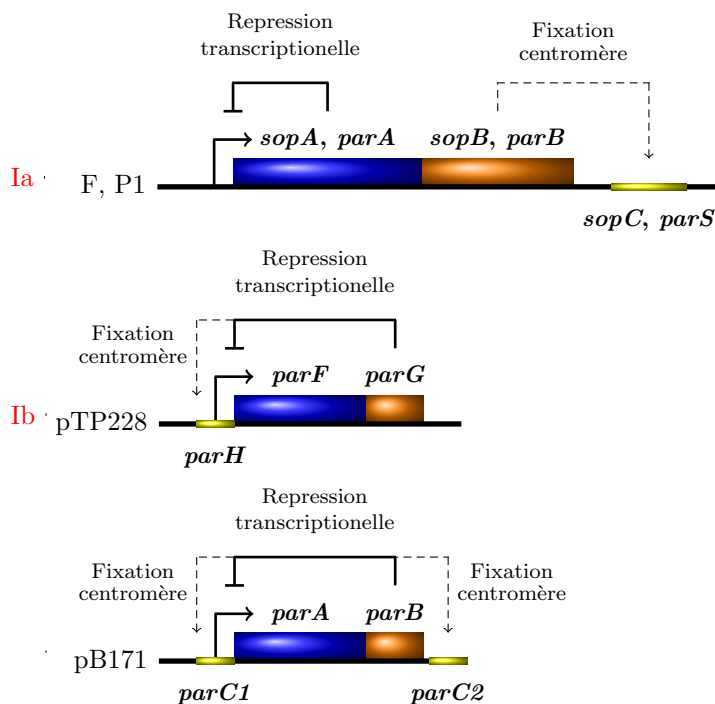
Chapitre 2

Les systèmes de partition

2.A Les acteurs de la partition plasmidique

La partition de la quasi-totalité des plasmides à bas nombre de copies connus est gérée par un module à trois composants, un centromère, une protéine se fixant au centromère, et une ATPase impliquée dans le déplacement des complexes centromère-protéines entraînant la molécule d'ADN plasmidique. Ces trois éléments ont d'abord été mis en évidence pour les plasmides F et P1. Les premières analyses génétiques ont été réalisées sur le plasmide mini-F, un dérivé du plasmide F, capable de se maintenir chez *E. coli*. L'analyse par délétion ou par insertion d'un transposon Tn3 a permis de définir une région essentielle à la stabilité située en dehors de la région essentielle à la réplication (Bergquist et al., 1981). Cette région est capable de stabiliser des plasmides instables porteurs de l'origine de réplication d'*E. coli* sans augmenter leur nombre de copies (Ogura and Hiraga, 1983; Ogura et al., 1980). L'analyse de cette région de partition par délétions successives et par des expériences de complémentation a mis en évidence deux gènes nommés *sopA* et *sopB* (pour stability of plasmid) agissant en trans et une région nommée *sopC*, agissant en *cis* et appelée séquence centromérique (Figure 7). Le séquençage nucléotidique a confirmé la présence de deux cadres de lecture *sopA* et *sopB* codant respectivement les deux protéines SopA et SopB. Les deux gènes sont organisés en opéron et sont transcrits à partir d'un promoteur unique *pSop* situé en amont de *sopA*. Le site centromérique *sopC* est reconnu spécifiquement par la protéine SopB, qui s'y fixe pour former un complexe nucléoprotéique, appelé complexe de partition (Hayakawa et al., 1985; Mori et al., 1986, 1989). Le même type d'organisation de ce locus de partition nommé *par* a aussi été découvert sur le plasmide P1 (Abeles et al., 1985; Austin and Abeles, 1983a). Depuis, d'autres systèmes de partition ont été découverts sur plusieurs plasmides à bas nombre de copies, et les systèmes les plus étudiés sont ceux des plasmides F, P1 et R1 d'*E. coli*. Les modules de partition des plasmides F,

Loci *par* de type I



Loci *par* de type II

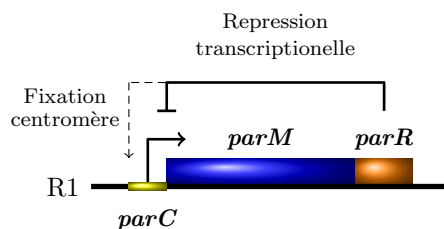


Figure 7 – **Organisation génétique des opérons *par* de type I et II**

Les loci de partition des principales familles sont représentés (type Ia : F et P1, type Ib : pTP228, type II R1). Les rectangles bleus représentent les gènes codant les ATPases, les rectangles oranges les gènes codant les protéines de liaison aux centomères et les rectangles jaunes les centromères. Les traits continus représentent les activités de régulation du centromère des gènes indiqués et les traits discontinus représentent la formation des complexes de partition.

P1 et R1 sont similaires, et possèdent tous un site centromérique étroitement lié aux deux gènes qui codent les protéines de partition (Figure 7). Bien que les protéines de partition du plasmide R1 soient fonctionnellement analogues aux protéines de partition de P1, elles ne montrent aucune homologie entre elles, alors que les protéines de partition de P1 et de F sont homologues. Les systèmes de partition sont donc classés en deux principales catégories. Cette classification est basée sur le type d'ATPase que code le système de partition (Gerdes et al., 2000). Les ATPases appartiennent soit au type I qui définit la famille des ATPases à motif Walker Box variant comme pour P1 et F (Motallebi-Veshareh et al., 1990), soit au type II qui définit la famille des NTPases de type actine comme pour R1 et pSK41 (Bork et al., 1992).

Récemment, une nouvelle famille de système de partition plasmidique a été identifiée. Cette nouvelle famille, appelée type III est représentée par le système de partition du plasmide pBtoxis de *B. thuringiensis* et n'est actuellement composée que de deux membres (Chen and Erickson, 2008; Larsen et al., 2007; Tang et al., 2006). L'organisation des gènes de partition est différente de celle des systèmes de type I et II. Le gène *tubR* codant la protéine potentielle de liaison au centromère est situé en amont du gène *tubZ* codant la NTPase (Larsen et al., 2007). La caractéristique de cette famille est l'appartenance de la protéine TubZ à la famille des GTPases à tubuline. Il a été montré que TubZ est nécessaire pour la partition du plasmide pBtoxis et ses propriétés, notamment sa capacité à polymériser *in vivo* et *in vitro* commencent à être étudiées (Chen and Erickson, 2008; Larsen et al., 2007). Cependant son rôle dans la partition n'est pas clairement défini. Cette nouvelle classe de système ne sera donc pas développée plus en détail dans ce manuscrit.

2.B Les systèmes de partition de type I

Le système de partition de type I est le système le plus répandu dans le monde bactérien. Les protéines ATPases sont appelées génériquement ParA, les protéines de liaison au centromère ParB et les sites centromériques *parS*. Selon l'organisation génétique de l'opéron *par* et l'homologie de séquence et de taille des protéines, le système de type I est divisé en deux sous catégories ; le groupe Ia dont les modèles d'études sont SopA du plasmide F ou ParA de P1, et le groupe Ib, dont les modèles d'études sont ParF du plasmide pTP228 ou ParA du plasmide pB171 (Figure 7). Dans les deux sous catégories, le gène codant l'ATPase se trouve en amont du gène codant la protéine de liaison au centromère. Le centromère du groupe Ia est localisé en aval de l'opéron *par* alors que celui du groupe Ib est localisé en amont de l'opéron *par*.

Les protéines ParA et ParB du groupe Ia sont respectivement composées d'en-

viron 251 à 420 résidus et de 182 à 336 résidus. Les protéines ParA possèdent un double rôle *in vivo*. Elles agissent directement dans le processus de partition (Davis et al., 1996), mais elles jouent aussi le rôle d'autorégulateur car elles sont capables de réguler la transcription de leur opéron *par* (Davis et al., 1992; Mori et al., 1989). Leur région N-terminale contient un motif prédit de liaison à l'ADN de type HTH (Helix-Turn-Helix) qui est en adéquation avec ce rôle de répresseur transcriptionnel. Il n'y a pas de similarité de séquence significative entre les protéines ParB. Seul un motif prédit HTH est la signature commune parmi les protéines ParB.

Les protéines ParA et ParB du groupe Ib sont significativement plus petites et sont respectivement composées d'environ 208 à 227 résidus et de 46 à 113 résidus. Les protéines ParA de ce groupe ne possèdent pas de motif de liaison à l'ADN. Ces dernières ne fonctionnent pas comme des régulateurs transcriptionnels. Dans le système de type Ib, cette fonction est assurée par les protéines ParB (Figure 7). En effet, les protéines ParB fixent la région centromérique qui dans ce groupe sert aussi de région autorégulatrice. Les protéines ParB ne contiennent pas de motif de liaison à l'ADN identifiable par analyse de séquence. En revanche, l'étude de la structure de la protéine de type ParB du système de partition du plasmide TP228 d'*E. coli*, nommé ParG, révèle que la fixation à l'ADN se fait par l'intermédiaire d'un motif RHH (Ribbon-Helix-Helix) (Golovanov et al., 2003).

2.B.1 Les systèmes de partition chromosomique

Comme énoncé précédemment, la majorité des bactéries porte sur leur chromosome des loci homologues aux loci de partition plasmidiques identifiés. L'organisation génétique des loci *parAB* est similaire à celle des systèmes de partition plasmidiques. Tous les systèmes *par* chromosomique identifiés sont de type I (Gerdes et al., 2000) et apparaissent comme des hybrides des groupes Ia et Ib. En effet, les protéines ParA sont de type Ib alors que les protéines ParB, qui possèdent des motifs HTH, sont très similaires aux ParB du groupe Ia. Il a été montré que les gènes *par* des bactéries jouent un rôle dans la ségrégation des chromosomes chez *B. subtilis*, *C. crescentus*, *Streptomyces coelicolor* et *Pseudomonas putida* (Godfrin-Estevenson et al., 2002; Iretton et al., 1994; Kim et al., 2000; Lewis et al., 2002; Mohl and Gober, 1997). Les détails varient d'espèce en espèce, mais quelques généralités émergent : (i) les gènes *par* sont toujours localisés proches de l'origine de répllication du chromosome ; (ii) les séquences des sites centromérique *parS* semblent conservées et sont des palindromes de 16 pbs, qui peuvent être imparfaits, (séquence consensus : 5' TGTTNCACGT-GAAACA 3' ; Lin and Grossman 1998) ; (iii) les protéines de partition contribuent à la partition mais ne sont pas responsables de la ségrégation de l'ensemble de la masse d'ADN du chromosome ; (iv) l'influence des gènes *par* varie souvent selon le

développement et les stades de croissance des cellules bactériennes. Dans la plupart des espèces testées, les gènes *par* ne sont pas essentiels à la survie des cellules, sauf pour *C. crescentus*. Cependant, les phénotypes dus aux mutations ou à la surexpression des gènes *par* indiquent que ces gènes contribuent au bon déroulement de la partition, au moins dans certaines conditions comme détaillés dans le paragraphe suivant.

2.B.1.a *Bacillus subtilis*

Les protéines ParA et ParB de *B. subtilis* sont respectivement appelées Soj et Spo0J car ces gènes ont initialement été identifiés pour leurs rôles dans la sporulation. Soj a d'abord été décrite comme étant un inhibiteur de l'initiation de la sporulation (Ireton et al., 1994). En effet, Soj est un inhibiteur de l'activation de Spo0A et réprime aussi l'expression de ce facteur de transcription nécessaire à l'expression des gènes précoces de la sporulation et cette inhibition est levée par l'action de Spo0J (Quisel and Grossman, 2000). Les premières indications de l'implication des protéines Par dans la ségrégation des chromosomes proviennent d'études génétiques qui montrent qu'une mutation du gène *spo0J* augmente de 100 fois la production de cellules anucléées (Ireton et al., 1994). La ségrégation du chromosome en phase végétative est donc affectée par la délétion de *spo0J*. Cependant, Soj n'est pas nécessaire pour la partition des chromosomes, car les mutants *soj* n'augmentent pas la fréquence des cellules anucléées (Ireton et al., 1994). L'implication de Soj dans la partition n'est donc pas évidente. En revanche, Spo0J et Soj sont absolument requis pour stabiliser un plasmide contenant les sites *parS* chez *B. subtilis* (Lin et al., 1997). Ceci suggère que le rôle de Soj dans la partition du chromosome n'est pas essentiel et que d'autres facteurs compensent son absence. Ce point est soutenu par le fait qu'un défaut de ségrégation est observé dans un double mutant *soj-smc*, *spo0J-smc* et un triple mutant *soj-spo0J-smc*, où l'apparition de cellules anucléées est observée à une fréquence d'environ 18 % (Lee and Grossman, 2006). Le simple mutant *smc* conduit à 2 % de ces cellules anormales. Il a également été montré que Soj et Spo0J participent à l'organisation de la région origine en une structure compacte, facilitant ainsi la séparation des origines répliquées du chromosome (Lee and Grossman, 2006) et que Spo0J est nécessaire pour le recrutement des complexes SMC à la région origine (Gruber and Errington, 2009; Sullivan et al., 2009). Ces études suggèrent que le défaut de ségrégation induit par la délétion de *soj* serait masqué dans une souche *smc*⁺ et que celui induit par la délétion de *spo0J* aurait un effet cumulé avec la perte de fonction de *spo0J* et l'absence de recrutement du complexe SMC à la région origine. Il semble donc que le système de partition et les protéines de compaction du nucléoïde jouent un rôle partiellement redondant dans

la ségrégation du chromosome.

2.B.1.b *Caulobacter crescentus*

Chez *C. crescentus*, les protéines ParA et ParB sont essentielles pour la viabilité des cellules (Mohl and Gober, 1997). La surexpression et l'inactivation des gènes *par* entraînent un défaut sévère de ségrégation de l'ADN et de division de la cellule (Mohl et al., 2001; Mohl and Gober, 1997). Ces études suggèrent que les actions antagonistes de ParA et de ParB forment un point de contrôle du cycle cellulaire qui inhibe la division lorsque les chromosomes ne sont pas complètement partitionnés.

2.B.1.c *Streptomyces coelicolor*

La ségrégation du chromosome de *S. coelicolor* est particulièrement intéressante car cette bactérie possède un chromosome linéaire et présente différents stades de différenciation cellulaire comme *B. subtilis*. Cet organisme filamenteux peut suivre une croissance végétative ou se différencier via une phase de sporulation. Lorsque la spore germe, elle forme un mycélium végétatif constitué d'hyphes multi-génomiques. En condition de carence, la bactérie développe des hyphes aériennes dont la croissance rapide s'accompagne d'une phase de réplication intensive, aboutissant à la présence de plus de cinquante chromosomes non ségrégés par hyphe. Le chromosome de *S. coelicolor* possède un opéron *parAB* proche de l'origine de réplication dont l'expression est régulée dans le temps (Jakimowicz et al., 2006; Kim et al., 2000). Vingt-quatre copies d'une séquence *parS* similaire à celle de *B. subtilis* ont été identifiées sur le chromosome de *S. coelicolor* et la plupart de ces séquences (21) se situent sur une région de 400 kb autour de l'origine de réplication (Kim et al., 2000). ParB purifiées fixent spécifiquement des fragments d'ADN contenant ces séquences *parS* (Jakimowicz et al., 2002). Chez *S. coelicolor*, la transcription de l'opéron *parAB* est fortement activée au cours de la sporulation. La délétion du système n'affecte pas la croissance ou l'apparence des colonies en phase végétative, mais cause une déficience dans la partition de l'ADN au cours de la sporulation. 13% des spores ne possèdent pas ou peu d'ADN (10 fois plus fréquent que pour la souche sauvage).

2.B.1.d *Pseudomonas putida*

L'implication de ParA et de ParB dans la ségrégation des chromosomes de *P. putida* est aussi conditionnelle, mais dans cet organisme, elle dépend de l'état physiologique des cellules (Godfrin-Estevenson et al., 2002; Lewis et al., 2002). Les délétions des gènes *parA* et/ou *parB* ne montrent que très peu de défauts dans la viabilité

et pas d'apparition significative de cellules anucléées au cours de la croissance des cellules dans un milieu riche. Cependant, dans un milieu de croissance minimum et spécifiquement au cours de la transition de la phase exponentielle à la phase stationnaire, les délétions de chacun des deux gènes provoquent une haute fréquence de cellules anucléées dans la population (dix fois plus que dans une souche sauvage). Les phénotypes sont similaires pour les mutations de *parA* et de *parB*, ce qui suggère que les deux protéines sont absolument requises pour la ségrégation du chromosome au cours de cette étape de transition.

2.B.1.e Conclusion sur les systèmes de partition chromosomique

Le rôle des systèmes *parABS* dans la ségrégation du génome des bactéries s'est avéré difficile à définir, du fait de la redondance fonctionnelle partielle des mécanismes impliqués dans le cycle cellulaire. L'étude de ces systèmes, au cours de phases de différenciation cellulaire, comme la sporulation ou le changement de phase de croissance a permis une meilleure compréhension de leur implication au cours de la ségrégation du chromosome. Ces phases nécessitent une prise en charge rapide, orientant et mobilisant le chromosome. Dans ces cas précis, les systèmes *parABS* sont les mieux adaptés, de par leur fonctionnement proche des systèmes mitotiques plasmidiques. Il est d'ailleurs intéressant de noter que le locus *parABS* du chromosome II de *V. cholerae* est essentiel au maintien du réplicon et qu'il est phylogénétiquement très proche des systèmes plasmidiques.

Certaines bactéries comme *E. coli* ne possèdent pas de système *parABS* chromosomique. Cependant chez *E. coli*, des études ont mis en évidence une séquence appelée *migS*, située dans le domaine Ori, qui possède une localisation précise au sein de la cellule (Yamaichi and Niki, 2004). Néanmoins, la délétion de cette séquence n'entraîne pas de défaut de partition et son insertion dans un plasmide instable ne le stabilise pas. De plus, aucune protéine capable de reconnaître cette séquence n'a été mise en évidence depuis cette première étude.

Les travaux réalisés sur la ségrégation des chromosomes bactériens ont permis de proposer que les systèmes *parABS* sont des modules de gestion des régions origines au cours de la ségrégation du chromosome qui assurent probablement une partition rapide lors de phases de développement particulières. Le modèle de ségrégation du chromosome bactérien le plus plausible, propose que les protéines ParA participent à la localisation de l'origine chromosomique nouvellement répliquée vers les pôles des cellules en agissant sur les complexes ParB-*parS* situés autour de l'origine. Les complexes ParB-*parS* recrutent ensuite à la région origine les complexes SMC qui vont organiser la région origine et conduire la ségrégation du chromosome en compactant l'ADN nouvellement répliqué (Figure 8). La partition des plasmides fait intervenir

un seul mécanisme actif et de ce fait donne aux systèmes de partition plasmidiques un réel intérêt pour la compréhension du mécanisme de partition. Dans la suite de ce manuscrit, je m'intéresserai principalement aux systèmes de partition plasmidiques.

2.B.2 Le système *parABS* des plasmides P1 et F

Comme indiqué précédemment les systèmes de partition de type I les plus étudiés sont ceux des plasmides P1 et F (Abeles et al., 1985; Austin and Abeles, 1983a,b; Ogura and Hiraga, 1983). Ces deux systèmes sont donc pris en exemple pour la description du système de partition de type I. Certaines particularités seront évoquées pour les systèmes de type Ib des plasmides TP228 et pB171.

Les plasmides P1 et F existent comme des unités répliquatives autonomes et stables chez *E. coli*. L'opéron *par* de P1 et de F code respectivement l'ATPase ParA, SopA et la protéine de liaison à l'ADN ParB et SopB. ParA/SopA et ParB/SopB sont requis pour la régulation de l'expression de l'opéron *par* et pour la ségrégation du plasmide. Les protéines ParB et SopB se fixent à leur site centromérique qui sont respectivement *parS* et *sopC* et forment ainsi des complexes nucléoprotéiques appelés complexe de partition.

2.B.2.a Les sites centromériques *parS*

Une séquence centromérique, ou centromère, se définit comme un site d'attachement du fuseau de microtubules aux chromosomes eucaryotes, assurant leur ségrégation durant la mitose ou la méiose. La partition des plasmides via les systèmes *parABS* se fait par la formation d'un complexe nucléoprotéique, le complexe de partition, constitué de protéines ParB qui s'assemblent à partir de la séquence *parS*. Par extension, les sites *parS* agissant en *cis* dans le processus de partition, ont été nommés « séquences centromériques ». Elles sont nommées séquences *parS* pour le plasmide P1, *sopC* pour le plasmide F, *parH* pour TP228 et *parC1* et *parC2* pour le plasmide pB171 ; ce dernier présentant la particularité de posséder deux loci *par* (un de type II et un de type Ib) (Figure 7). Bien que leur fonction soit la même, chaque centromère présente des structures particulières. Ils sont composés de plusieurs motifs répétés en orientation directe ou inversée, et le nombre des répétitions, leurs séquences et leurs longueurs diffèrent énormément (Figure 9). Les séquences centromériques de F et de P1 sont décrites ici.

La séquence centromérique du plasmide P1 est un cas particulier et présente une structure plus complexe que celle des autres systèmes. *parS* de P1 est composé de quatre répétitions d'une séquence d'ADN de 7pb appelées boîte A (ATTTTCAC/A)

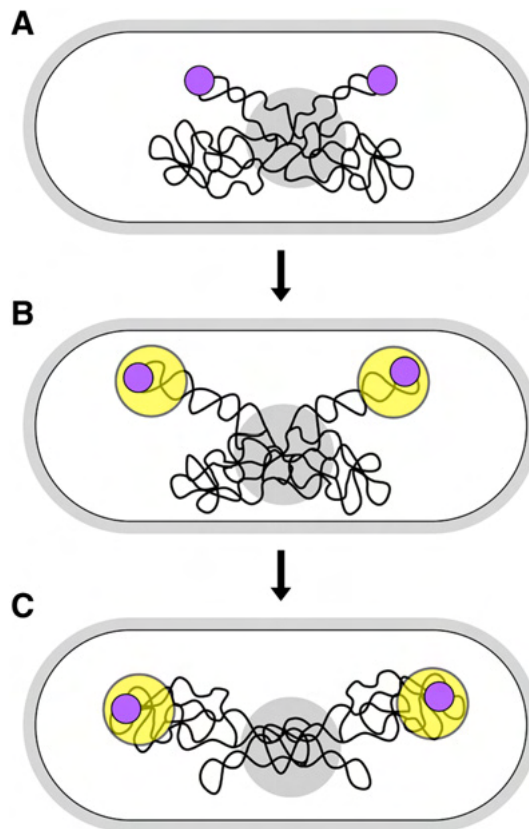


Figure 8 – **Modèle proposé pour la ségrégation des chromosomes bactériens**
A) Après la réplication de la région origine, ParA (pas représentée) participe au positionnement des origines en agissant sur ParB (cercle mauve) fixée sur les sites *parS*. B) Le complexe ParB-*parS* recrute le complexe de condensation SMC (cercle jaune) sur des origines repositionnées. C) SMC organise cette région et participe à la ségrégation des chromosomes en compactant l'ADN qui émerge du réplisome (cercle gris) localisé au centre de la cellule. (D'après Sullivan et al. 2009.)

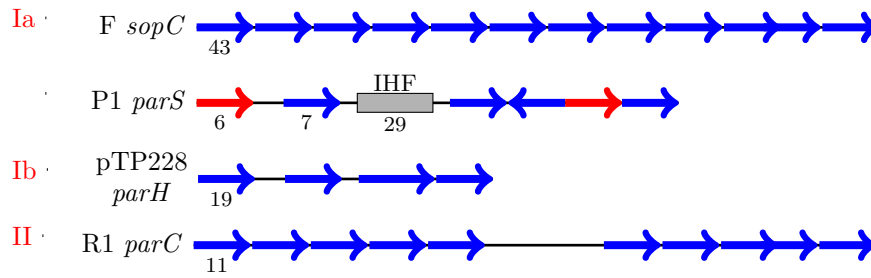
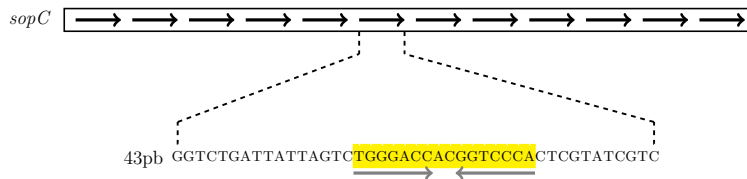


Figure 9 – **Représentation de diverses régions centromériques**
 Les flèches sont une représentation schématique des éléments répétés de chaque centromère. Le nombre de nucléotides de chaque élément est indiqué en dessous des flèches. Pour *parS* de P1, les flèches rouges représentent les éléments de la boîte B, les flèches bleues les éléments de la boîte A et le site IHF est représenté par un rectangle gris.

A



B

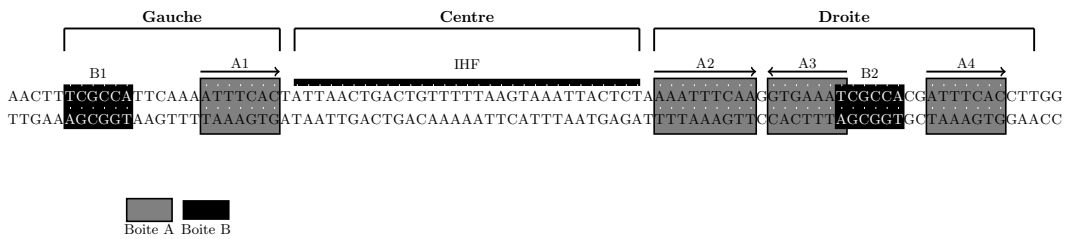


Figure 10 – **Sites centromériques *sopC* et *parS* du plasmide F et du prophage P1**

A) *sopC* est composé de douze répétitions d'un motif de 43pb (flèche noire) comprenant chacun deux séquences de 7pb inversées répétées (flèche grise) séparées par 2pb qui constituent le site de fixation de SopB (rectangle jaune). **B)** Les rectangles gris et noirs représentent respectivement les motifs des boîtes A et B de *parS*. La région de fixation d'IHF est représentée par un trait noir. Les répétitions des boîtes A sont indiquées par des flèches.

et de deux répétitions d'une séquence de 6pb appelées boîte B (TCGCCA). Le site *parS* peut-être divisé en trois principales parties : gauche, centrale et droite (Figure 10B). La partie droite, composée de 34 pb, est suffisante pour permettre la partition *in vivo* (Martin et al., 1987) et une interaction spécifique avec ParB *in vitro* (Davis et al., 1990; Funnell and Gagnier, 1993). La partie de gauche, composée de séquence d'une boîte A et d'une boîte B, ne supporte pas à elle seule la partition (Martin et al., 1987). La région centrale est composée d'une séquence de fixation de la protéine IHF (Integration Host Factor) (Funnell, 1988). IHF est une petite protéine qui induit une forte courbure de l'ADN lors de sa fixation (Rice et al., 1996). La courbure créée lors de la fixation d'IHF sur la région centrale de *parS* (Funnell, 1991) permet le rapprochement des parties gauche et droite de *parS* (Funnell and Gagnier, 1993). IHF fait partie du complexe de partition et augmente l'affinité de ParB pour *parS* d'un facteur d'au moins 10000 (Funnell, 1991). Les fixations de ParB et de IHF sont coopératives et ParB augmente ainsi l'affinité d'IHF pour *parS* (Funnell and Gagnier, 1994). IHF n'est pas indispensable pour la partition de P1, toutefois en son absence, la partition est sensiblement moins efficace du fait de l'affinité très réduite de ParB à *parS* (Funnell, 1991; Funnell and Gagnier, 1993).

Le site centromérique du plasmide F, *sopC*, possède une organisation plus simple. Il est composé de douze répétitions directes d'un motif nucléotidique de 43pb (Figure 10A) (Helsberg and Eichenlaub, 1986; Mori et al., 1986). Chaque répétition contient un motif de 16pb, reconnu spécifiquement par un dimère de SopB, et composé de deux séquences de 7pb (TGGGAC) inversées répétées et séparées par 2pb (AC) (Hayakawa et al., 1985; Mori et al., 1986). Bien qu'une seule répétition soit suffisante pour la fixation de SopB et pour la partition (Biek and Shi, 1994), les 12 répétitions sont importantes pour une efficacité optimale de la partition.

2.B.2.b Les propriétés physiques des protéines ParB

Les comparaisons de séquence indiquent que deux régions sont conservées chez les ParB_{Ia}. Ces régions correspondent à un domaine, de fonction inconnue, situé en N-terminal appelé motif B et un motif de liaison à l'ADN HTH situé dans la partie centrale des ParB (Hanai et al., 1996; Lobočka and Yarmolinsky, 1996).

Chez ParB de P1 les résidus 142-333 sont nécessaires pour la liaison au centromère, alors que les résidus 1-141 sont requis pour l'interaction avec l'ATPase ParA (Figure 11). La détermination de la structure de ParB(142-333) complexée à une petite séquence de *parS* (Schumacher and Funnell, 2005) a montré que ParB(142-333) est composée de deux domaines séparés (Figure 12). Le premier domaine (résidus 147-270) contient le motif HTH, et est composé de sept hélices α . Ce domaine est connecté au domaine C-terminal (résidus 275-333) par une région flexible (résidus

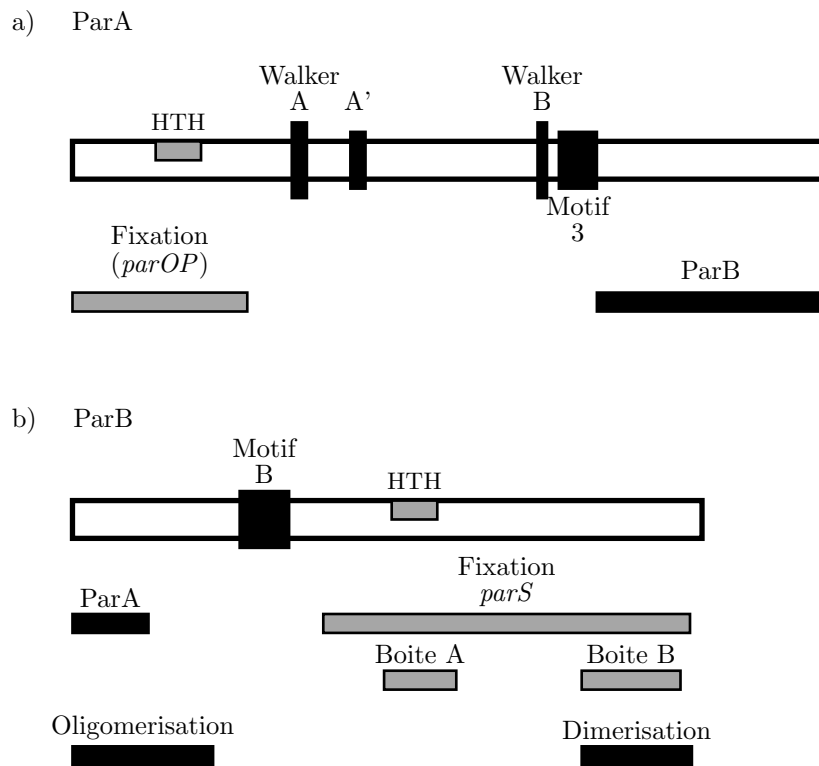


Figure 11 – Séquences conservées et domaines fonctionnelles de (a) ParA de P1 et (b) ParB de P1

Chaque protéine est représentée par un rectangle blanc. Les motifs de fixation à l'ADN (HTH) sont dessinés en gris sur chaque rectangle et les positions des autres motifs conservés sont dessinées en noir. Les rectangles au-dessous de chaque protéine montrent les régions pour lesquelles une spécificité ou une fonction est définie. Les rectangles gris correspondent aux fonctions et spécificités de fixation à l'ADN et les rectangles noirs correspondent aux autres propriétés.

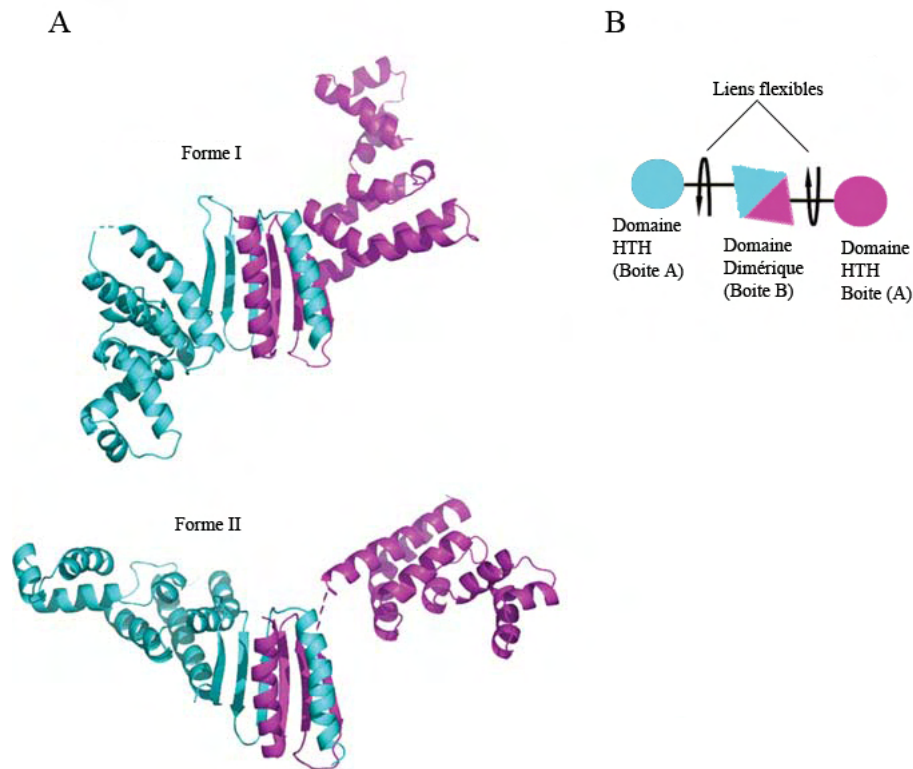


Figure 12 – Structure de ParB (142-324) de P1

A) ParB forme un dimère avec une structure variable (deux formes présentés ici) grâce au lien flexible existant entre le domaine HTH et le domaine de dimérisation. Une sous-unité est colorée en bleu et l'autre en violet. B) Représentation de la flexibilité d'un dimère de ParB (coloré comme en A) avec le domaine HTH (cercle) attaché au domaine dimérique (triangle) par un lien flexible. (D'après Schumacher and Funnell 2005)

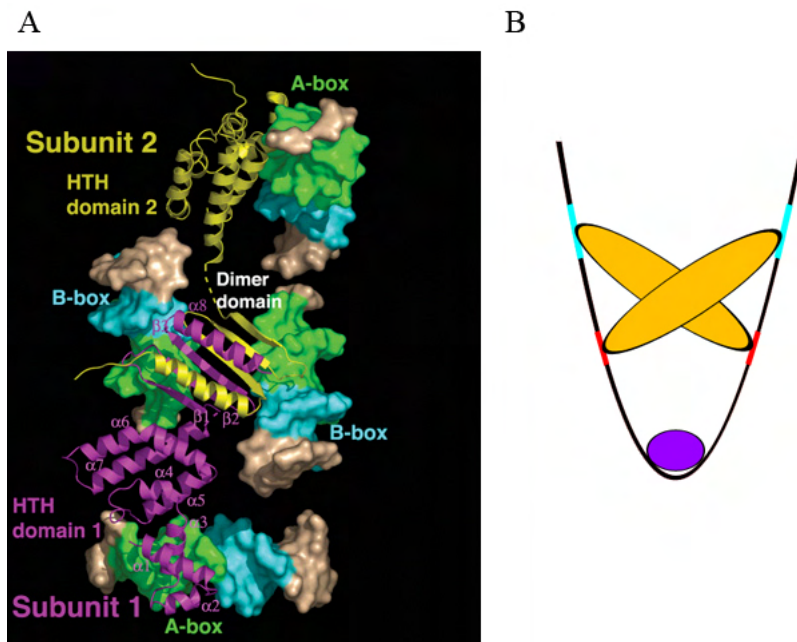


Figure 13 – **Strucutre de dimère de ParB (142-324) fixé à l'ADN**

A) Structure de deux sous-unités de ParB (jaune et violet) fixées à une petite séquence *parS* composé des boîtes A3 (vert) et B2 (bleu). Le domaine HTH de chaque monomère reconnaît une boîte A3 et le domaine de dimérisation peut fixer deux boîtes B2 appartenant à deux sites *parS* différents. (Extrait de Schumacher 2008). B) Représentation schématique de la reconnaissance des boîtes A (bleu) et B(rouge) d'un site *parS* par un dimère de ParB (orange). Cette reconnaissance est facilitée par la courbure du site *parS* induite par la fixation d'IHF (violet). (D'après Bouet and Funnell 1999; Bouet et al. 2000.)

271-274). La région C-terminale contient un domaine de dimérisation, et est composée de trois brins β antiparallèles et d'une hélice α en C-terminale. Ce dernier verrouille deux monomères de ParB en dimère et pour former un feuillet de brin β antiparallèle continue. La structure a permis d'identifier un autre domaine de fixation à l'ADN dans le domaine de dimérisation. Elle permet de comprendre comment ParB peut interagir avec les multiples boîtes contenues dans les sites de *parS* (Figure 13). Chaque boîte est fixée par un module de fixation à l'ADN individuel. Les boîtes A sont fixées par les motifs HTH, alors que les boîtes B sont reconnues par le domaine de dimérisation C-terminal. Les deux modules de fixation à l'ADN n'interagissent pas entre elles, et peuvent pivoter librement contactant ainsi de multiples combinaisons de boîtes A et B dans la boucle de *parS*.

Trois domaines d'interaction ont été mis en évidence pour SopB de F (Hanai et al., 1996; Ravin et al., 2003). Les résidus 1 à 42 comprennent le domaine d'interaction avec SopA. Le motif HTH se trouve entre les résidus 174 à 201 et en C-terminal, les résidus 245 à 323 comprennent le domaine de dimérisation de SopB (Figure 14). Les résidus 36 à 72 pourraient contenir un autre domaine impliqué dans d'oligomérisation de SopB sur l'ADN (Hanai et al., 1996). Des études sur la structure de SopB (Schumacher et al., 2010) ont montré que la région 155-270 est constituée de sept hélices α (Figure 15A). Cette région peut-être divisée en deux unités fonctionnelles, une région contenant le motif HTH et une région C-terminale contenant les deux dernières hélices α qui dimérisent avec leur homologue d'une autre unité de SopB fixé à un autre complexe d'ADN. La structure des résidus 275-323 révèle que cette région composée de trois brins β et d'une hélice α forme un dimère (Figure 15B-C). Comme pour ParB de P1, les hélices α de deux unités de SopB interagissent ensemble et permet la formation d'un feuillet β continu. Bien que cette région de SopB présente peu d'homologie de séquence avec celle de ParB, la région des deux protéines a la même topologie $(\beta_3\alpha)_2$, mais pas la même fonction, car le domaine dimérique de SopB ne possède aucune activité de liaison à l'ADN.

2.B.2.c Les propriétés physiques de ParA

Les alignements de séquences de différentes ParA_{Ia} montrent quatre principales régions similaires (Koonin, 1993; Motallebi-Veshareh et al., 1990). Trois d'entre eux contribuent à la fixation de l'ATP :

- le motif Walker A interagit avec les phosphates des nucléotides à purine
- le motif Walker B permet la fixation d'un ion Mg^{2+} , cofacteur de la réaction. Elle possède un résidu aspartate conservé et nécessaire à l'hydrolyse de l'ATP
- le motif A' contient un résidu aspartate conservé impliqué dans l'hydrolyse de l'ATP.

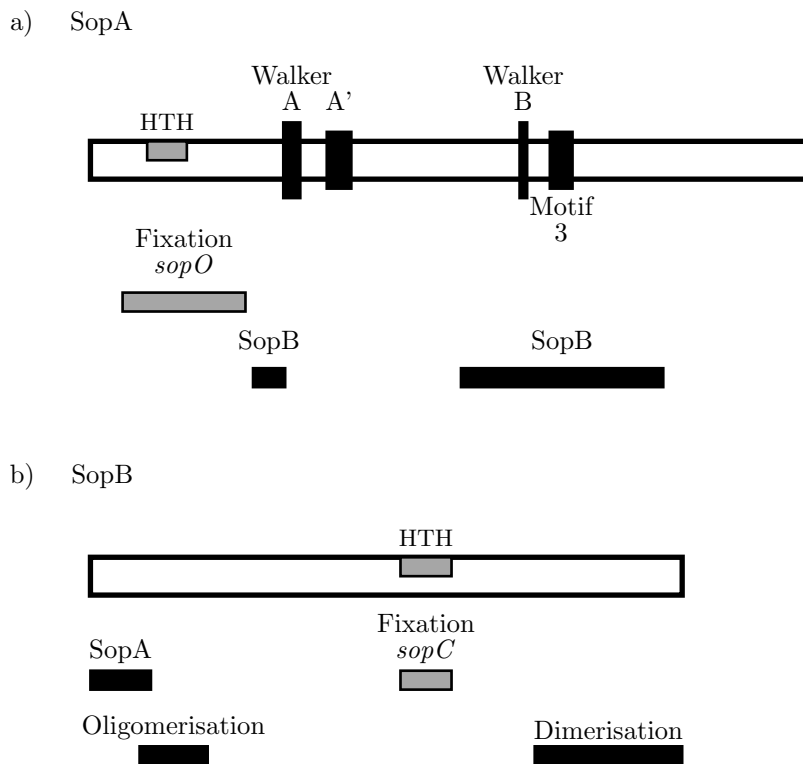


Figure 14 – Séquences conservées et domaines fonctionnelles de (a) SopA de F et (b) SopB de F

Chaque protéine est représentée par un rectangle blanc. Les motifs de fixation à l'ADN (HTH) sont dessinés en gris sur chaque rectangle et les positions des autres motifs conservés sont dessinées en noir. Les rectangles au-dessous de chaque protéine montrent les régions pour lesquelles une spécificité ou une fonction est définie. Les rectangles gris correspondent aux fonctions et spécificités de fixation à l'ADN et les rectangles noirs correspondent aux autres propriétés.

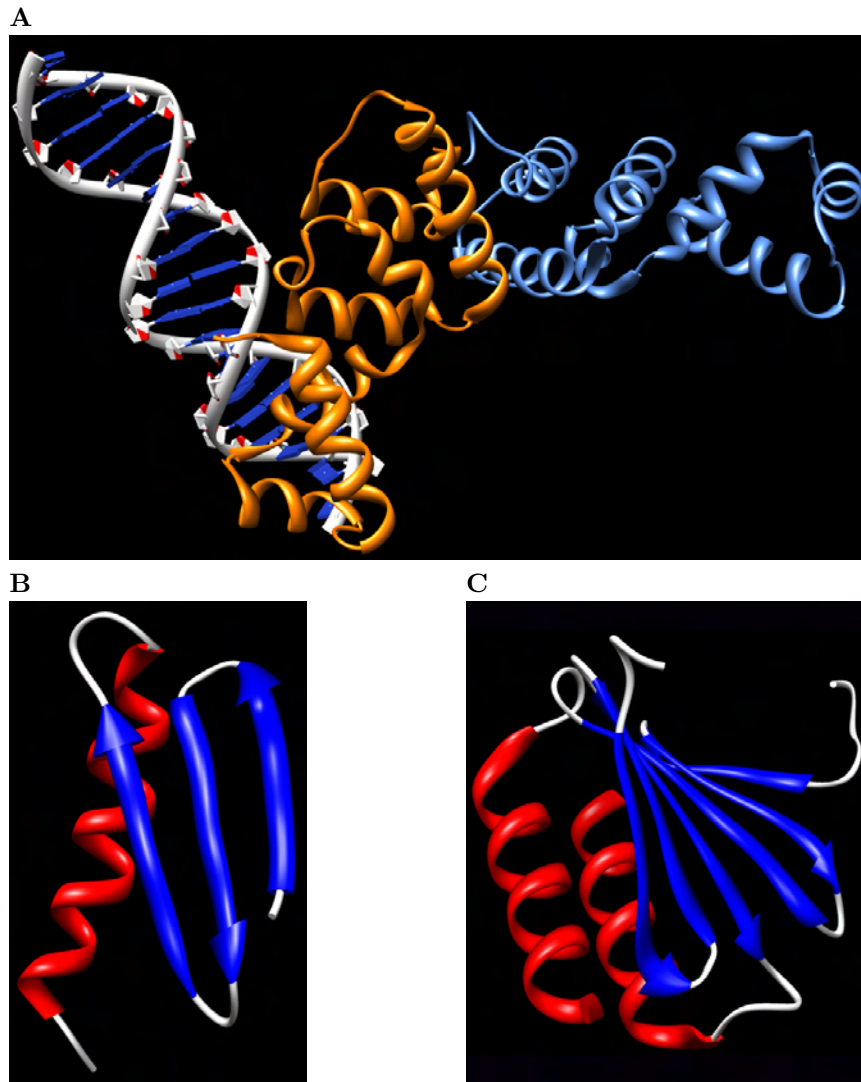


Figure 15 – Structure de SopB(155-272) et de SopB(275-323)

A) Structure d'un dimère de SopB(155-272)(orange et bleu) fixé à l'ADN. B-C) Structure de SopB(275-323) représentant le domaine C-terminal de SopB. Les hélices α sont dessinées en rouge et les brins β en bleu. Un monomère (B) et un dimère (C) sont représentés. (D'après Schumacher et al. 2010.)

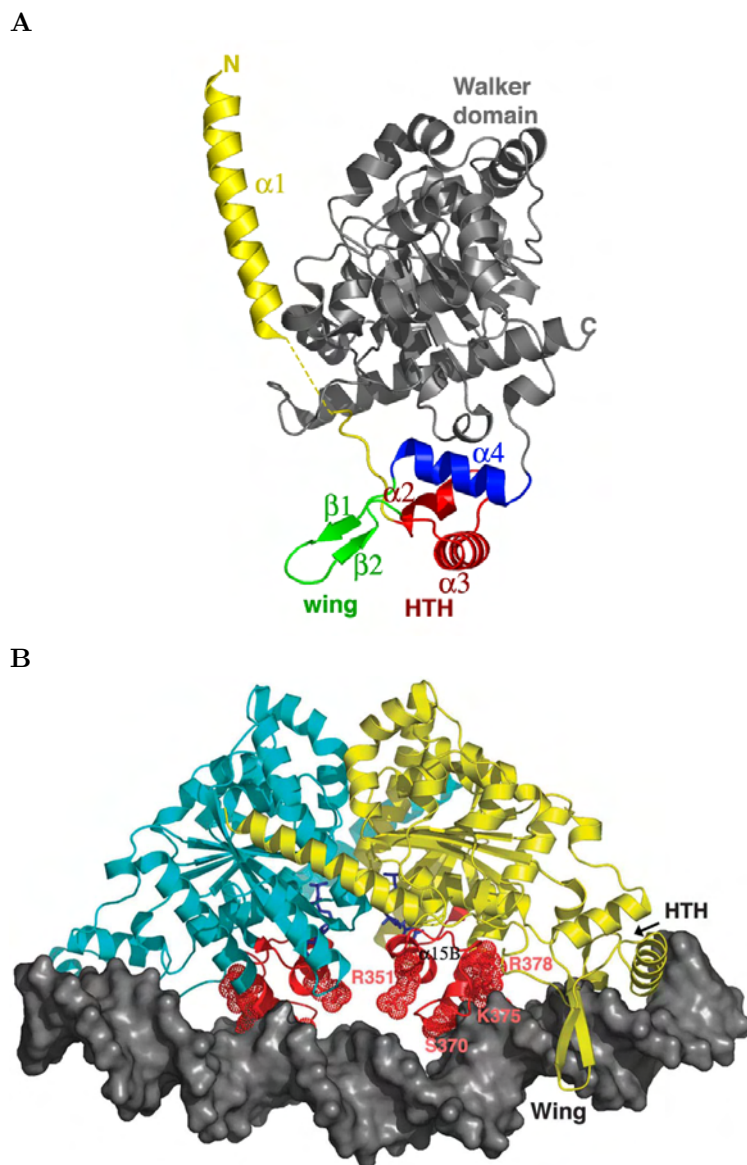


Figure 16 – Structure de ParA de P1

A) Représentation schématique de l'orientation du domaine N-terminal de liaison à l'ADN d'une sous-unité de ParA de P1. L'hélice N-terminale qui participe à la dimérisation est colorée en jaune et le lien flexible au motif « winged-HTH » est indiqué par des pointillés jaunes. Le motif HTH est coloré en rouge, le brin $\beta 1$, $\beta 2$ et la boucle entre les deux sont colorés en vert. L'hélice $\alpha 4$ qui connecte le domaine N-terminal de liaison à l'ADN au domaine Walker (gris) est coloré en bleu. B) Modèle de l'interaction entre le dimère de ParA-ADP (bleu clair et jaune) et l'ADN (gris). Le motif HTH permet la principale fixation à l'ADN. Les régions basiques (rouge) structurées par la fixation de l'ADP (bleu foncé) permettent d'établir un second contact avec l'ADN, renforçant ainsi la fixation de ParA au promoteur de l'opéron *par*. (Extrait de Dunham et al. 2009.)

Des mutations dans ces motifs altèrent les propriétés de fixation et d'hydrolyse de l'ATP de ParA (Davis et al., 1996; Fung et al., 2001; Libante et al., 2001). Des études de structures sur les ATPases à motif Walker NifH, ArsA et MinD (Georgiadis et al., 1992; Hayashi et al., 2001; Sakai et al., 2001; Schindelin et al., 1997; Zhou et al., 2000), qui ne sont pas des protéines de partition, ont montré que ces trois motifs sont impliqués dans la fixation des nucléotides ATP et ADP. Leur poche d'ATP, ressemble à celle des protéines G eucaryotes, impliquée dans la transduction du signal. Les équivalents des motifs A' et Walker B sont respectivement appelés motifs « switch I » et « switch II », car ils seraient impliqués dans la transduction des signaux de fixation et d'hydrolyse de l'ATP aux autres régions de la protéines et aux autres partenaires protéiques (Fung et al., 2001; Hayashi et al., 2001; Jang et al., 2000). Les motifs de ParA peuvent avoir les mêmes fonctions. La quatrième région conservée est adjacente au motif Walker B et est appelée Motif 3. Ce motif de fonction inconnue, est proche ou fait partie de la région de ParA qui interagit avec ParB. Les protéines ParA de P1, de F et de quelques autres plasmides ont une extension de cent acides aminés environ dans la région N-terminale qui n'est pas retrouvée chez plusieurs homologues. Cette région supplémentaire possède un domaine HTH de liaison à l'ADN qui reconnaît spécifiquement la région opératrice de l'opéron *par* (Davis et al., 1992; Hayes et al., 1994; Mori et al., 1989; Ravin et al., 2003).

La structure de ParA de P1, résolue récemment (Dunham et al., 2009), confirme les études précédentes et montre que ParA contient en N-terminale, une hélice α étendue approximativement des résidus 1 à 43; un motif « Winged-HTH » des résidus 44-104, où le motif HTH (α_2 et α_3) est situé entre les résidus 44 à 68; et un large domaine C-terminal contenant le domaine Walker box variant (résidus 105 à 399) avec le motif Walker A des résidus 116 à 124, le motif Walker A' des résidus 147 à 155 et le motif Walker B des résidus 246 à 251 (Figure 16).

La structure de SopA n'est toujours pas résolue actuellement, mais comme ParA de P1, SopA possède un motif HTH (résidus 40-61), un motif Walker A (résidus 112-121), un motif A' (résidus 135-148), un motif Walker B (résidus 237-241) et un motif 3 (résidus 253-265). Une étude sur les domaines fonctionnels de SopA (Ravin et al., 2003) confirment que les résidus 27 à 92, comprenant le domaine HTH, sont importants pour la fixation spécifique aux régions opératrices de *sop*, et que l'interaction avec SopB s'effectuerait au niveau de deux régions situées respectivement entre les résidus 96 à 113 et les résidus 206 à 313.

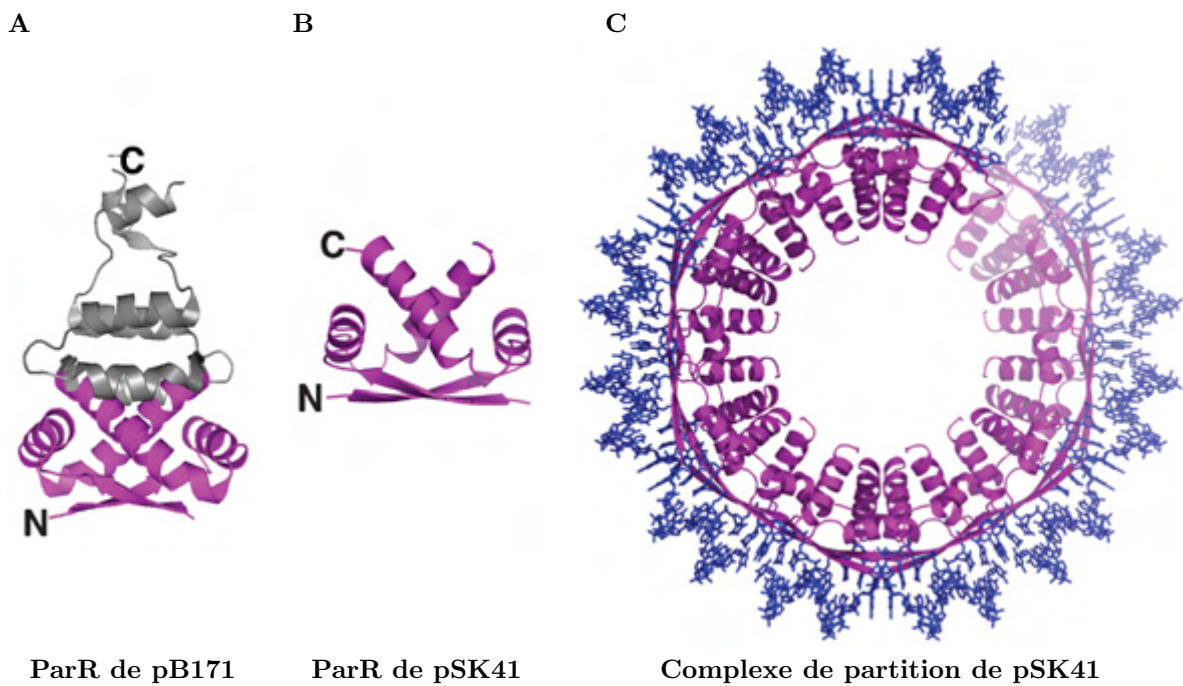


Figure 17 – **Structure de liaison au centromère de type II**

A) Structure de ParR de pB171 d'*E. coli*. Le domaine RHH N-terminal est coloré en magenta, et la région C-terminale en gris. B) Structure de ParR de pSK41 de *Staphylococcus aureus*. Le domaine RHH N-terminal est coloré en magenta. C) Structure d'un complexe de ParR de pSK41 en présence d'ADN (bleu). (Extrait de Schumacher 2008.)

2.C Les systèmes de partition de type II

Le système de partition de type II est très peu répandu. Il n'est présent que sur les plasmides et comprend une dizaine de membres (Gerdes et al., 2000). La NTPase est appelée ParM et appartient à la superfamille des actines/hsp70 (heat-shock protein 70). La protéine de liaison au centromère est appelée ParR et le centromère *parC*. Comme pour le système de type Ib, le gène *parR* est situé en aval du gène *parM* et le site centromérique en amont du locus *parMR*. Les protéines ParM sont composées d'environ 236 à 336 résidus, alors que les protéines ParR, plus petites, sont composées d'environ 46 à 120 résidus. Les protéines ParR agissent comme autorégulateurs transcriptionnels tout comme les protéines ParB du type Ib et les protéines ParM ne montrent pas d'activité de liaison à l'ADN.

2.C.1 Le système *parMRC* du plasmide R1

Le système de partition de type II le plus étudié est celui du plasmide R1 d'*E. coli* (Figure 7). La NTPase ParM est une protéine de 37,5 KDa capable de fixer l'ATP et le GTP (Jensen and Gerdes, 1997; Popp et al., 2008). La protéine de liaison au centromère ParR est une protéine de 13,3 KDa capable de fixer spécifiquement le centromère de R1 *parC*, constitué de deux clusters de cinq répétitions de 11pb, qui sont localisés de chaque côté du promoteur de l'opéron (Breüner et al., 1996; Dam and Gerdes, 1994). Les 10 répétitions sont requises pour une partition efficace.

2.C.2 Structure des complexes ParR-centromère

Le plasmide pB171 d'*E. coli* a la particularité de posséder deux systèmes de partition, *par1* de type II et *par2* de type I (Ebersbach and Gerdes, 2001). Comme pour le plasmide R1 la protéine ParR se fixe au centromère du locus de type II porté par ce plasmide. La structure des résidus 6 à 95 de ParR a été résolue (Moller-Jensen et al., 2007)(Figure 17A). Les structures des trente-cinq résidus en C-terminal et des résidus 1 à 5 n'ont pas été résolues. La structure contient deux monomères formant une unité asymétrique, où chaque monomère est composé d'un brin β en N-terminal suivi de cinq hélices α . La région de dimérisation en N-terminale forme une structure RHH₂, composée d'un feuillet β antiparallèle accompagné de deux hélices α de chaque monomère. La protéine ParG codée par le locus de partition de type Ib du plasmide TP228 fait aussi partie de cette famille (Golovanov et al., 2003). La caractéristique des protéines à motif RHH₂ est la nature coopérative de leur liaison à l'ADN. Dans le cristal, ParR de pB171 est assemblée en une structure hélicoïdale continue de 12 paires de dimères de ParR formant un tour complet de 360° et de 15nm de diamètre. Les dimères de ParR sont positionnés de sorte que

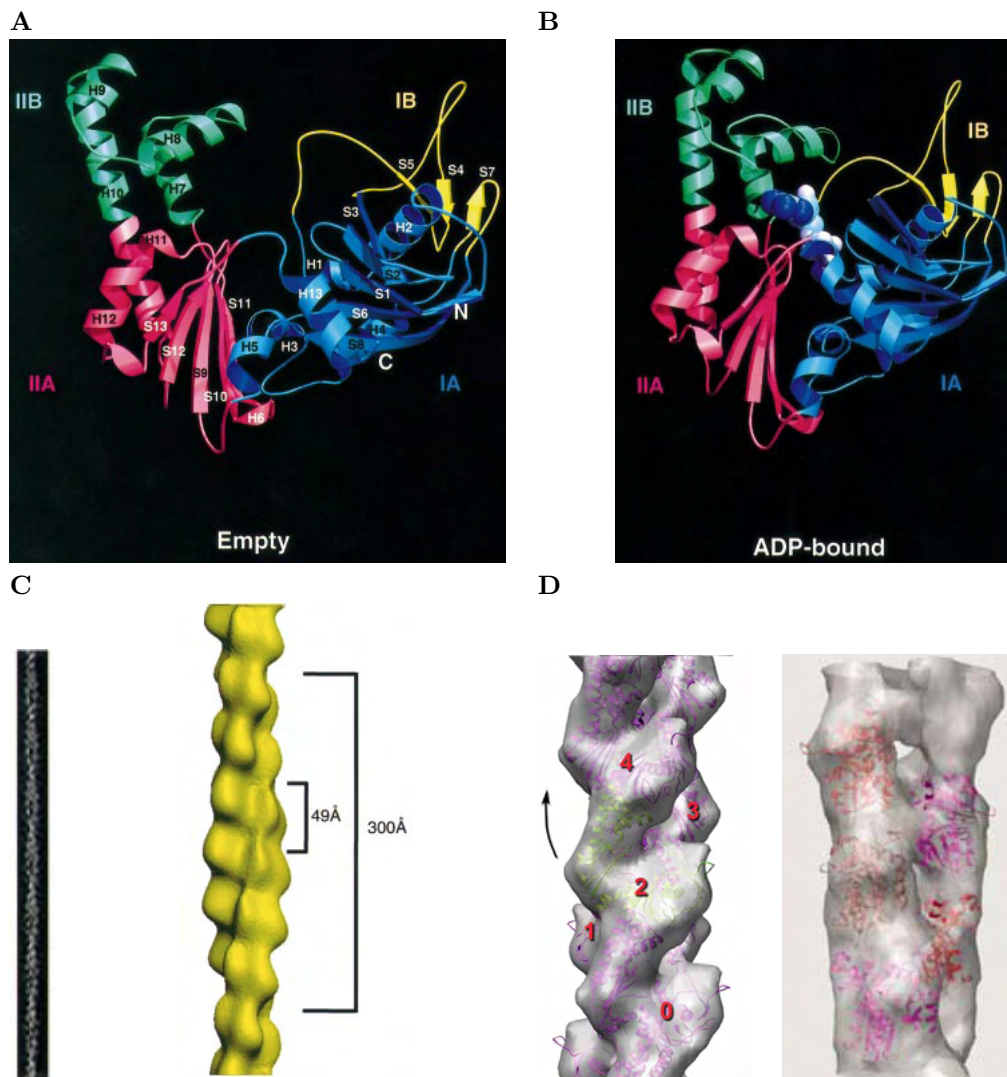


Figure 18 – **Structure de ParM et des filaments de ParM**

A-B) Représentation du diagramme d'un dimère ParM sous forme libre (A) ou sous forme complexé à l'ADP (B). C) A gauche, image d'un filament de ParM en ME et à droite reconstruction tridimensionnelle d'un filament de ParM. D) A gauche reconstruction tridimensionnelle d'un filament de ParM (Orlova et al., 2007) avec en transparence cinq sous-unités de ParM. La flèche représente l'enroulement gauche du filament. A droite, reconstruction tridimensionnelle d'un filament de ParM (Popp et al., 2008) (Extrait de Orlova et al. 2007; Popp et al. 2008; Van Den Ent et al. 2002.)

leur région N-terminale est orientée vers l'extérieur de la structure et leur région C-terminale vers l'intérieur. Les domaines de reconnaissance de l'ADN sont donc orientés vers l'extérieur de l'hélice ParR, ce qui permet à l'ADN de s'enrouler autour. Des études sur la fixation de ParR de R1 sur son site *parC* en microscopie électronique (Moller-Jensen et al., 2007) ont confirmé que le complexe de partition de ParR-*parC* forme une structure en anneaux de 15 à 20 nm de diamètre. Les auteurs ont suggéré que les images de microscopie électronique ne sont pas des anneaux, mais probablement des projections de la nature hélicoïdale des arcs observés pour ParR de pB171.

La cristallisation du complexe ParR-centromère de type II du plasmide pSK41 a permis de préciser la structure de ces complexes (Schumacher et al., 2007). Elle montre que comme pour ParR de pB171, ParR de pSK41 contient un motif RHH₂ grâce à la dimérisation de son domaine N-terminal (Figure 17B). Des analyses de retard sur gel et de protection de l'ADN par empreinte à la DNaseI montrent que ParR du plasmide R1 fixe de manière coopérative les dix répétitions directes de *parC* en formant un grand complexe nucléoprotéique qui inclue également la région promotrice localisée entre les deux clusters (Moller-Jensen et al., 2003). Par la nature coopérative des ParR fixés, les dimères de protéines liés à l'ADN forment des interactions étroites qui conduisent à la création d'une superstructure protéique continue distinguant ainsi les surfaces électrostatiques positives ou négatives (Figure 17C). Cette superstructure de 18 nm de diamètre est de nature hélicoïdale et confirme les hypothèses émises sur les complexes ParR-centromère de R1 et de pB171.

Ces données indiquent une conservation dans l'assemblage des complexes de partition de type II et suggèrent donc que cette structure nucléoprotéique est importante pour le processus de partition.

2.C.3 Structures des protéines et filaments de ParM

Les structures de ParM de R1 sous forme libre ou complexée avec l'ADP (Van Den Ent et al., 2002) confirment que ParM possède bien un repliement caractéristique des protéines de la famille des actines : deux domaines appelés I et II respectivement divisés en deux sous-domaines A et B (Figure 18A-B). En général, chez les actines, les deux petits sous-domaines (IB et IIB) sont très variables en taille et en structure alors que les deux grands sous-domaines partagent un repliement commun composé de cinq brins β surenroulés par trois hélices α . La comparaison des deux structures de ParM (ParM libre/ParM-ADP) montre que la fixation à l'ADP induit une fermeture des deux domaines (I et II) qui subissent une rotation de 25°. En présence de GDP, les structures obtenues présentent les mêmes conformations (Popp et al., 2008).

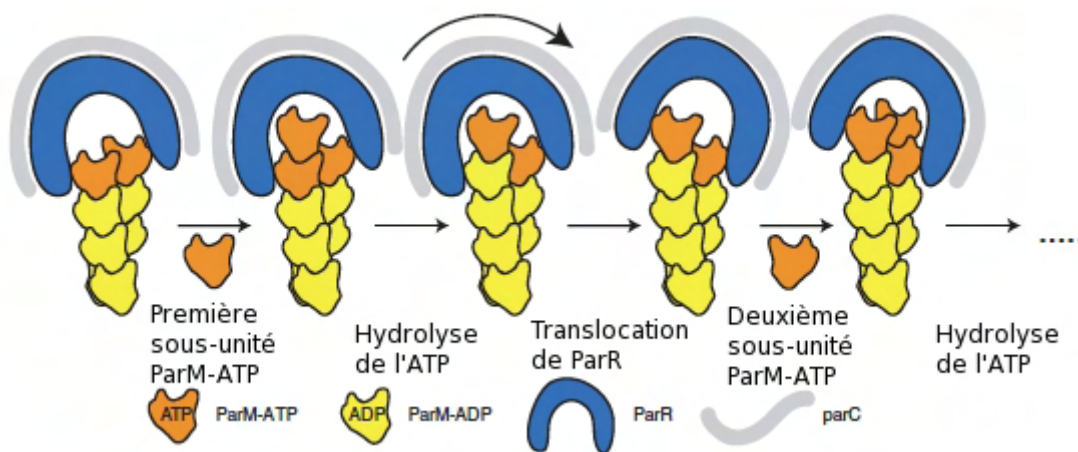


Figure 19 – **Modèle de la polymérisation de ParM en « marche d’escalier »**
 L’hélice de ParR, fixée à parC, reconnaît les sous-unités ParM-ATP. Une seule sous-unité ParM-ATP s’ajoute sur un des deux protofilaments (1). L’hydrolyse de l’ATP (2) crée une translocation processive de l’hélice ParR (3). Une nouvelle sous-unité de ParM-ATP s’insère sur l’autre protofilament et engage un deuxième cycle (4). (D’après Salje and Löwe 2008.)

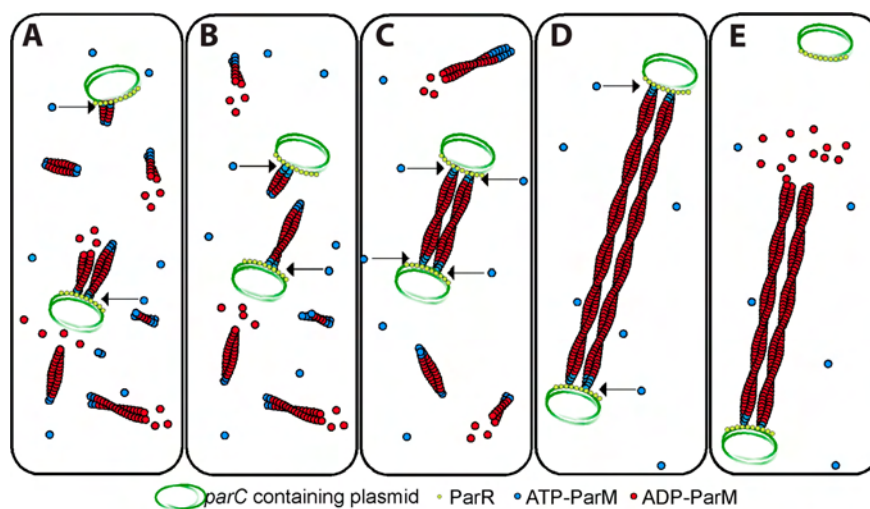


Figure 20 – **Modèle de la partition du plasmide R1**

A : la nucléation de nouveaux filaments de ParM est initiée au complexe ParR-parC. Le filament attaché recherche un second complexe de partition. B : les plasmides diffusent dans la cellule jusqu’à être suffisamment proches pour se rencontrer. C : Les filaments fixent un plasmide à chacune de leur extrémité, formant un fuseau. Les filaments sont alors stabilisés. D : Ces filaments continuent à polymériser, « poussant » les plasmides aux pôles de la cellule. E : Après l’arrivée aux pôles, le filament est dissocié du plasmide et dépolymérise rapidement. (Extrait de Campbell and Mullins 2007.)

Des études récentes montrent que les filaments de ParM ont une fonction directe dans la ségrégation des plasmides (Campbell and Mullins, 2007; Garner et al., 2004; Popp et al., 2008). Initialement, la visualisation des filaments de ParM, provient d'observation microscopique par immunofluorescence. ParM forme des polymères dynamiques qui s'étendent le long des cellules d'*E. coli* (Moller-Jensen et al., 2002) et ces polymères se forment aussi *in vitro* en présence d'ATP ou de GTP (Moller-Jensen et al., 2002; Popp et al., 2008). En microscopie électronique (ME), ces polymères sont observés sous forme de filaments ordonnés (Figure 18C). *In vivo* et *in vitro* les filaments de ParM présentent une forte instabilité dynamique et sont stabilisés si chaque bout du filament est associé au complexe de partition ParR-*parC* (Campbell and Mullins, 2007; Garner et al., 2004). Des analyses en ME montrent qu'un seul et unique filament de ParM peut présenter à ces deux extrémités un complexe ParR-*parC* (Choi et al., 2008; Salje and Löwe, 2008). La croissance des filaments est possible grâce à l'incorporation de molécules de ParM-ATP supplémentaires au niveau des complexes ParR-*parC* (Garner et al., 2004). Le filament croît de manière bidirectionnelle et pousse les plasmides aux pôles des cellules, puis il dépolymérise rapidement. Sur des cryosections de cellules, ces filaments sont visualisés en « fagot », toujours orientés suivant l'axe de la cellule et localisés autour du nucléoïde (Salje et al., 2009). De manière remarquable, ce système a été reconstitué *in vitro* simplement avec ces trois composants et de l'ATP. Dans ces conditions, des billes magnétiques complexées avec des sites *parC*, sont poussées en présence des protéines purifiées ParR et ParM à une vitesse comparable à celle observée lors de la séparation des plasmides R1 dans la cellule (Campbell and Mullins, 2007; Garner et al., 2007). Ceci indique que ce système *parRMC* est suffisant à la partition et ne nécessite pas l'intervention de facteurs de l'hôte. Deux modèles des filaments de ParM ont été reconstitués grâce aux données de ME et de cryo-ME (Orlova et al., 2007; Popp et al., 2008) (Figure 18D). Dans ces deux modèles, les filaments de ParM sont similaires sur leur forme et leur dimension, mais contrairement aux filaments d'actine qui ont un pas d'hélice droit, les filaments de ParM ont un pas d'hélice gauche. Les extrémités sont composées de monomères de ParM-ATP (ou GTP) alors que le filament est composé de ParM-ADP (ou GDP) (Popp et al., 2008; Van Den Ent et al., 2002). Salje et Löwe ont proposé un modèle en « marche d'escalier », basé sur l'ajout séquentiel de monomères de ParM-ATP sur chaque protofilament, entraînant le déplacement successif du complexe ParR-*parC* (Figure 19).

Ces études ont permis d'émettre pour le système de partition de type II, le modèle de la polymérisation insertionnelle d'actine, le « pushing », dans lequel les filaments de ParM s'insèrent entre les deux plasmides pour les propulser aux pôles des cellules (Figure 20). Selon ce modèle, après la formation du complexe de partition, les plas-

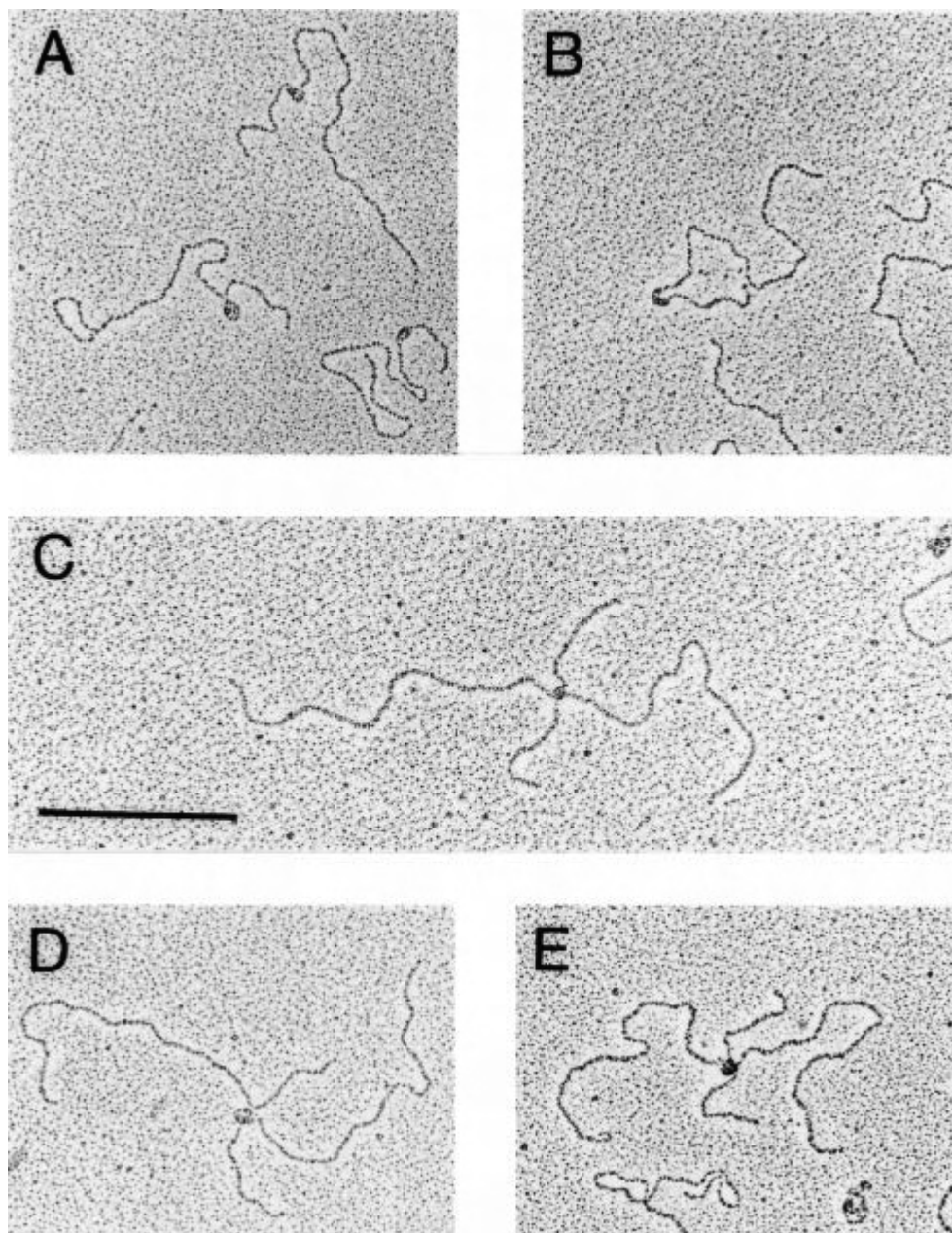


Figure 21 – **Appariement de plasmides R1**

(A-E) Observation en ME des complexes de partition formés sur les plasmides R1 et de l'appariement spécifique de deux molécules d'ADN au niveau du complexe de partition (C-E). La barre correspond à un kb. (Extrait de Jensen et al. 1998.)

mides seraient appariés. Cet appariement des plasmides R1 aux sites centromériques *parC* a été observée directement par ME (Figure 21) (Jensen et al., 1998). L'instabilité dynamique du filament pourrait être un contrôle permettant de prévenir les évènements précoces de polymérisation. Pour se stabiliser, chaque bout du filament doit être attaché à un complexe de partition. Le filament de ParM se formerait donc entre les complexes appariés, prêts à être séparés, et s'étendrait en déplaçant ainsi les plasmides à chaque pôle de la cellule.

Chapitre 3

Mécanismes moléculaires des systèmes de partition de type I

Les systèmes de partition de type I sont les systèmes les plus répandus dans le monde bactérien et sont ceux présents sur les chromosomes. Bien que ces systèmes soient très étudiés, les mécanismes moléculaires de la partition ne sont pas encore élucidés. Dans ce chapitre, je détaillerai l'état actuel de nos connaissances sur les fonctions des éléments des systèmes de partition de type I.

3.A Le rôle des protéines de liaison au centromère et des centromères dans la partition

La première étape de la partition implique une fixation des protéines de liaison au centromère à leur site centromérique. Bien qu'il n'existe que très peu d'homologie entre les sites centromériques et entre leur protéine de liaison, cette interaction conduit dans tous les cas à la formation d'un complexe nucléoprotéique de haut poids moléculaire appelé complexe de partition. Comme pour R1, la topologie adoptée par chaque complexe de partition doit être importante pour le recrutement de leur protéine motrice respective.

3.A.1 La topologie du complexe de partition

La topologie du complexe de partition SopB-*sopC* du plasmide F, est la plus étudiée. SopB, dimère en solution, se lie à *sopC* sous forme dimérique. Cette fixation induit sur les plasmides extraits des cellules, un déficit d'environ douze supertours négatifs (Biek and Shi, 1994; Biek and Strings, 1995; Lynch and Wang, 1994). Cette contrainte topologique existe même en présence d'une seule copie de 43pb de *sopC* (un déficit de neuf supertours négatifs). Ceci indique qu'un dimère de SopB fixé

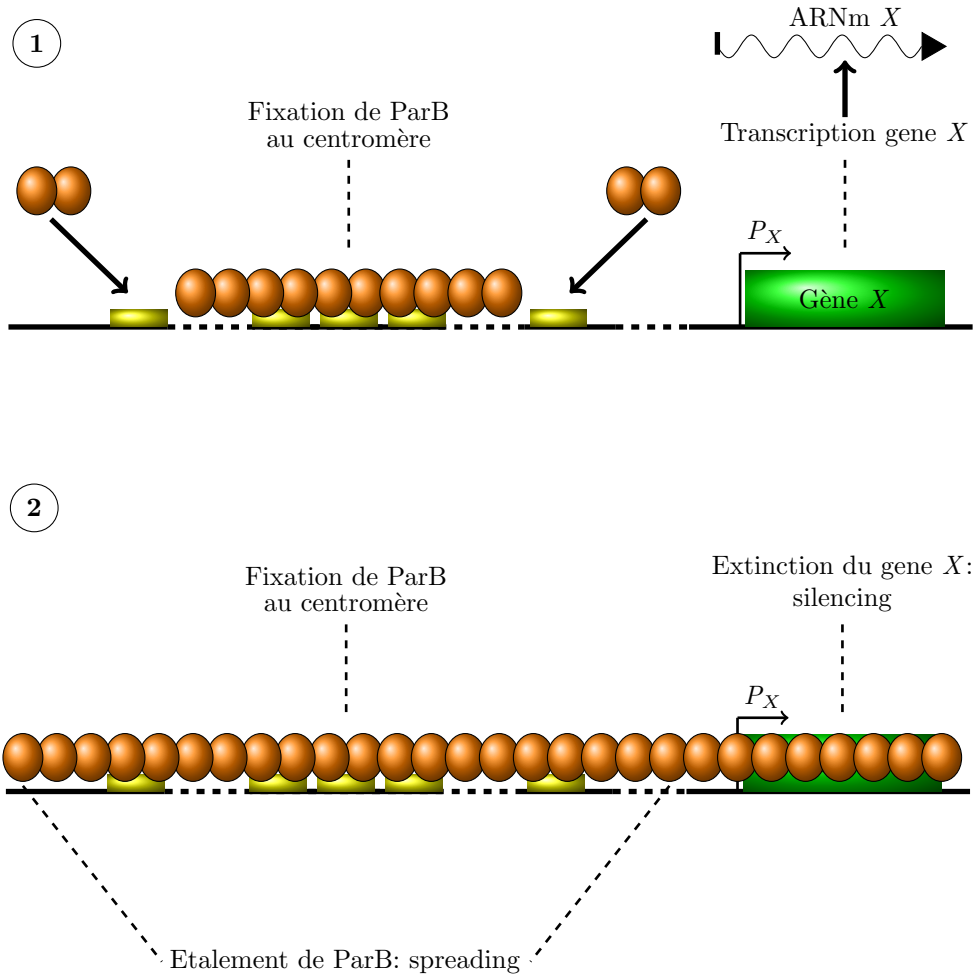


Figure 22 – Modèle de l'étalement des protéine ParB autour du site centromérique

Les dimères de ParB (orange) se fixent aux sites centromériques (jaune) (1) et s'étale sur l'ADN permettant l'extinction des gènes voisinant (gène X en vert) (2) qui est transcrit en absence de l'étalement (1).

sur *sopC* peut recruter d'autres molécules de SopB sur l'ADN non spécifique flanquant grâce aux interactions SopB-SopB et créer ainsi un complexe de partition étendu. Il a été suggéré que ce déficit de supertours négatifs est la conséquence d'un enroulement de l'ADN contenant *sopC* autour de SopB, créant ainsi une zone de supertours positifs. Cette hypothèse a été réfutée récemment (Bouet and Lane, 2009). En effet, dans des conditions *in vivo* et *in vitro*, les auteurs ont démontré que SopB n'introduisait pas de supertours positifs sur des plasmides circulaires fermés ou relâchés. De plus, les auteurs ont montré que la fixation spécifique de SopB sur un site *sopC* induit une courbure de l'ADN de 50° au maximum, et cette courbure n'est pas strictement additive. En effet, la fixation de SopB sur deux sites *sopC* n'induit qu'une courbure de 70°. SopB qui ne se fixerait que sur les dix ou onze des douze répétitions du site *sopC* (Mori et al., 1989), pourrait introduire au maximum entre un et deux supertours. Ceci est insuffisant pour expliquer le déficit de douze supertours. Les auteurs suggèrent donc que la fixation de SopB sur *sopC* et son étalement sur les régions adjacentes protègent l'ADN de l'action de l'ADN gyrase (Lynch and Wang, 1995). Le complexe de partition formerait ainsi une structure suffisamment rigide pour résister à la transmission de changements topologiques intervenant normalement dans l'ADN dans les régions sans SopB du plasmide.

ParB de P1 est aussi un dimère en solution (Funnell, 1991) et un dimère fixe *parS* pour former avec IHF le complexe initial de haute affinité (Bouet et al., 2000). A partir de l'assemblage du complexe cœur, se chargent plusieurs dimères de ParB pour créer un grand complexe *in vitro* (Bouet et al., 2000). La fixation initiale de ParB et de IHF sert de point de nucléation pour les autres molécules de ParB grâce probablement aux interactions protéine-protéine et protéine-ADN. La taille de ce complexe *in vivo* est inconnue, mais des expériences de biologie cellulaire montrent que ParB, détectée par immunofluorescence, forme des foci intenses en présence de *parS* (Erdmann et al., 1999). Les auteurs suggèrent que la plupart des milliers de molécules de ParB se trouvant dans la cellule convergent vers les sites *parS*. Cependant le nombre minimum de molécules de ParB nécessaire pour former le complexe de partition et pour la partition n'est pas connu.

3.A.2 L'étalement de ParB sur l'ADN

Comme indiqué par ces résultats les complexes de partition ne sont pas confinés aux sites de fixation spécifiques mais peuvent attirer d'avantage de protéines pour s'étendre sur l'ADN avoisinant (Figure 22). L'étalement des protéines ParB sur l'ADN non spécifique flanquant les sites centromériques est appelé « spreading ». Cet étalement peut se faire sur plusieurs kilobases de part et d'autre des sites centromériques. Ce phénomène, initialement découvert par la capacité de SopB sur-

produite d'éteindre l'expression d'un gène de résistance à un antibiotique placé au voisinage de *sopC* (Lynch and Wang, 1995), est aussi observé avec ParB de P1 (Rodionov et al., 1999) ainsi que pour les homologues chromosomiques ParB de *S. coelicolor* (Jakimowicz et al., 2002) et Spo0J de *B. subtilis* (Murray et al., 2006). Ceci suggère que le spreading peut être une caractéristique commune des protéines ParB. Le rôle du « spreading » dans la partition n'est pas compris. Initialement une étude génétique sur la sélection de mutants ParB (P1) déficients pour le « spreading » montre que ces mutants sont aussi déficients pour la partition (Lobocka and Yarmolinsky, 1996). Ces données suggèrent que le « spreading » de ParB a un rôle dans la partition. Cependant l'importance du « spreading » pour la partition est remise en question, car des études postérieures ont montré que ces mutants de ParB sont aussi déficients pour d'autres fonctions de ParB essentielles pour la partition (Edgar et al., 2001; Hao and Yarmolinsky, 2002). Une étude plus récente qui consistait à limiter le « spreading » de ParB par l'introduction de sites de fixation des protéines RepA et GAL4 de part et d'autre de *parS*, indique que le « spreading » n'est probablement pas essentiel pour la partition car les plasmides sont perdus à un taux très faible (Rodionov and Yarmolinsky, 2004).

L'extinction des gènes même à plusieurs kilobases des sites centromériques est la conséquence du « spreading ». Ce phénomène est appelé « silencing » (Figure 22). Pour ParB de P1, il semblerait que la formation d'un nucléofilament ParB-ADN empêche la fixation de l'ARN polymérase sur la région couverte par les nucléofilaments (Rodionov et al., 1999). L'étalement des protéines ParB serait facilité par la capacité de multimérisation des dimères de ParB via leur domaine N-terminal. De manière similaire, SopB de F peut éteindre des gènes localisés à plusieurs kilobases de *sopC*. L'ADN devient alors inaccessible aux protéines cellulaires telles que l'ARN polymérase mais aussi l'ADN gyrase (Lynch and Wang, 1995). Le domaine N-terminal de SopB est aussi nécessaire au « silencing » des gènes proches de *sopC* bien que son implication dans la multimérisation n'ait pas été démontrée (Lynch and Wang, 1995). L'étalement de SopB est aussi facilité par sa capacité à interagir avec de l'ADN non spécifique (Bouet et al., 2007).

Ce phénomène de « spreading » n'est pas nécessaire au processus de partition car son blocage n'induit qu'une faible déstabilisation des plasmides. En revanche, ce léger effet laisse penser que la formation d'un complexe étendu de partition faciliterait les étapes ultérieures du processus de partition, notamment l'appariement des plasmides (Rodionov and Yarmolinsky, 2004) ou la concentration locale des molécules de ParA.

3.A.3 L'appariement des plasmides

La localisation des plasmides portant des systèmes de partition dans les cellules bactériennes et ayant plusieurs copies par cellule, montrent un seul focus au centre de la cellule ou deux foci au position $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ de la cellule quelques soient les conditions de croissance (Gordon et al., 1997; Niki and Hiraga, 1997). Ces observations indiquent que ces positions sont habitées par des groupes ou des amas de plasmides. Il semblerait que les plasmides partitionnés activement, soient attachés ensemble ou appariés au cours du cycle cellulaire, et que l'appariement soit accomplie par les composants du système de partition, grâce notamment à la formation du complexe de partition. L'appariement des plasmides a été initialement suggérée car d'une part chaque copie du plasmide doit être positionnée de sorte que les plasmides puissent être dirigés de part et d'autre de la cellule et non pas dans le même compartiment, et d'autre part parce que l'appariement aléatoire des plasmides, donne une explication à l'incompatibilité. Cela signifie que les plasmides qui utilisent des mécanismes similaires ou identiques de ségrégation ne peuvent coexister dans la même cellule (Austin and Nordstrom, 1990; Bouet et al., 2007). Dans la plupart des modèles de partition, ce phénomène est expliqué par le fait que tous les plasmides présents dans la cellule et possédant le même site centromérique seront appariés ou attachés par le site centromérique au cours du cycle cellulaire. Dans ce cas, l'appariement a pour conséquence le regroupement des plasmides sans distinction, ce qui rend la distribution des plasmides aléatoire dans les cellules filles. La titration des protéines ParB en compétition pour leurs sites centromériques portés par les différents plasmides présents dans la cellule, est un des modèles alternatifs proposés pour expliquer l'incompatibilité (pour revue Bouet et al. 2007).

Il y a quelques évidences sur l'existence de l'appariement comme un intermédiaire de la partition. Chez le système P1, une approche topologique a été utilisée pour démontrer que, *in vivo*, des sites *parS* présents sur des plasmides dimériques interagissent entre eux à forte concentration de ParB (Edgar et al., 2001). De plus, la structure de ParB montre que la libre rotation des domaines de ParB impliqués dans la fixation à l'ADN permettrait l'interaction entre deux plasmides porteurs des mêmes sites *parS* (Schumacher, 2007).

Dans le cas des systèmes de partition de type II, l'appariement des plasmides R1 aux sites centromériques *parC* a été observée directement par ME (Figure 21) (Jensen et al., 1998). L'appariement nécessite la protéine de liaison à l'ADN ParR et est stimulée par l'ATPase ParM et l'ATP.

Aucune analyse de ME n'a permis, jusqu'à présent de visualiser l'appariement de deux molécules d'ADN via les protéines ParB des systèmes de type Ia. De même, aucun événement d'appariement n'a été observé *in vivo*, dans des conditions où

la protéine ParB ne soit pas surexprimée. Il est possible que dans des conditions normales, cet événement ait lieu de manière extrêmement transitoire et dynamique, ne permettant pas sa détection par les techniques actuelles de microscopie. Bien que les évidences de l'appariement restent indirectes, et que l'utilité de l'appariement n'a pas encore été démontrée la discussion suivante supposera que cet événement existe.

3.B Les ATPases ParA : moteurs de la partition

Après l'étape supposée d'appariement des plasmides, les protéines ParA sont recrutées au complexe de partition et activent la séparation des plasmides. Ces protéines sont impliquées dans le déplacement des plasmides et sont de ce fait considérées comme les protéines moteurs de la partition. Le ou les mécanismes impliquant les protéines ParA dans la séparation des plasmides, n'est toujours pas défini. La suite de ce manuscrit, cible plus particulièrement les ATPases de type I. Nous aborderons le rôle des protéines moteur ParA dans la partition.

3.B.1 L'activité ATPase

Toutes les ATPases ParA de type I possèdent des caractéristiques communes pour leur fonction d'hydrolyse (Barilla et al., 2005; Bouet et al., 2007; Davis et al., 1992; Leonard et al., 2005; Pratto et al., 2008; Watanabe et al., 1992). Les protéines ParA ont une activité ATPase intrinsèque très faible qui varie selon les ParA de 0,3 à 1,4 mole d'ATP hydrolysée par heure et par mole de ParA. L'activité d'hydrolyse est stimulée d'un facteur d'environ de 2 par l'ADN et d'un facteur d'environ 3 à 5 par ParB. La stimulation de l'activité ATPase est plus importante en présence des deux cofacteurs ParB et l'ADN (facteur 10 à 40) sauf pour le système de partition du plasmide TP228 où la stimulation reste équivalente à celle exercée par ParG seule (Barilla et al., 2005). Jusqu'à présent et contrairement au système de partition de type II du plasmide R1, les études s'accordent sur le fait que pour le système de partition de type I, un ADN contenant le site centromérique stimule l'activité ATPase de la même manière qu'un ADN non spécifique (Davis et al., 1992; Watanabe et al., 1992). Cependant, une étude récente sur le système de partition de type I du plasmide pSM19035 de *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*), montre qu'en présence du site centromérique *parS* et de ω_2 (ParB), la stimulation de δ_2 (ParA) pourrait être légèrement plus importante qu'en présence d'un ADN non spécifique (Pratto et al., 2008). Néanmoins pour ce système de partition, les facteurs de stimulation de ParA sont très faibles et sont d'environ de deux pour l'ADN non spécifique et de trois pour l'ADN spécifique. Au laboratoire, nous avons montré que la stimulation

de l'activité ATPase de SopA par SopB et l'ADN non spécifique est d'un facteur quarante alors que la stimulation par SopB et un ADN contenant *sopC* est d'un facteur cent vingt (Ah-Seng et al., 2009). Ces résultats et le mécanisme d'activation de l'hydrolyse d'ATP par SopB et l'ADN seront présentés dans la partie résultats.

L'activité ATPase de ParA est importante pour la partition. En effet, les mutations inhibant l'hydrolyse de l'ATP entraînent un défaut de partition (Barilla et al., 2007; Davis et al., 1996; Fung et al., 2001; Libante et al., 2001). Cependant, le rôle de la fixation et de l'hydrolyse de l'ATP de ces protéines dans le processus de partition n'est pas encore compris.

3.B.2 L'autorégulation des opérons *par* et *sop*

Les ATPases de type Ia fonctionnent dans la partition mais aussi dans la transcription de leur opéron *par* (Figure 7). ParA(P1) et SopA (F) fixent les sites opérateurs de leur région promotrice *parOP* et *sopOP* (Figure 23) par l'intermédiaire de leur motif HTH (Davis et al., 1992; Hayes et al., 1994; Mori et al., 1989; Ravin et al., 2003). Ces deux protéines fixent les nucléotides adénines qui induisent des changements de conformation probablement importants pour leur activité (Davey and Funnell, 1997; Libante et al., 2001).

Dans le cas de ParA de P1, l'activité de liaison spécifique à l'ADN de ParA est modulée par la fixation et l'hydrolyse des nucléotides adénine (Bouet and Funnell, 1999; Davey and Funnell, 1994, 1997; Fung et al., 2001). Des expériences d'empreinte à la DNaseI montrent que l'ATP stimule d'un facteur 10 la fixation à la région opératrice alors que l'ADP et les analogues non hydrolysable de l'ATP stimulent la fixation d'un facteur de 50 à 100 fois plus (Davey and Funnell, 1994). Les auteurs ont suggéré que la fixation de ParA aux nucléotides adénine stimule son activité de liaison à l'ADN, alors que l'action d'hydrolyser est inhibitrice. Davey et Funnell ont montré que la fixation aux nucléotides affecte l'état oligomérique de ParA, poussant l'équilibre monomère-dimère vers la formation de dimères (Davey and Funnell, 1994). Leurs observations suggèrent que ParA doit être dimérique pour fixer son promoteur et que la forme ParA-ADP est un meilleur répresseur de la transcription que ParA hydrolysant l'ATP. Des expériences de retard sur gel ont confirmé que la forme ParA-ADP permettait une meilleure reconnaissance de la région *parOP* (Bouet and Funnell, 1999).

Dans le cas du plasmide F, la fixation de SopA à son promoteur ne nécessite pas la présence de nucléotide, mais en présence d'ADP, SopA se fixe aussi à son promoteur de manière spécifique (Bouet et al., 2007; Mori et al., 1989). En revanche, en présence d'ATP, cette propriété de fixation spécifique *sopOP* est inhibée (Bouet et al., 2007). Comme pour ParA de P1, la forme SopA-ATP n'est pas la forme répresseur et la

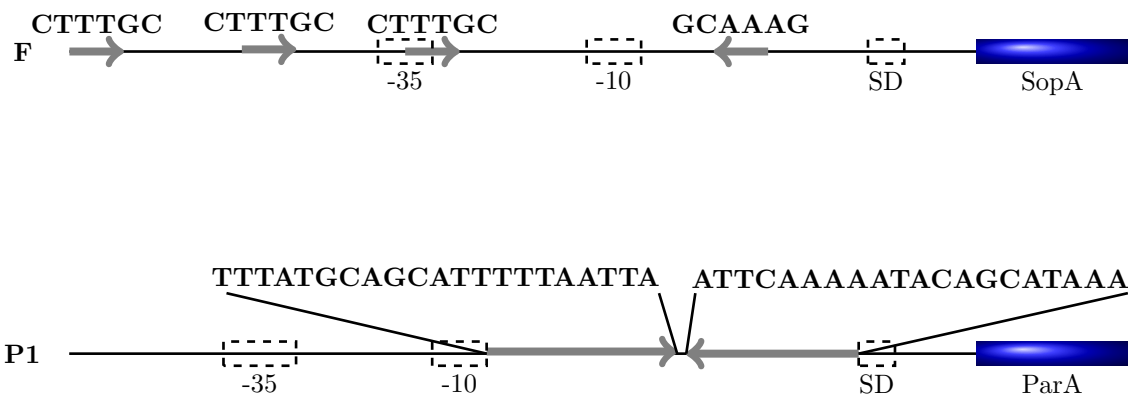


Figure 23 – Régions promotrices des opérons *sop* et *par* des plasmide F et P1

Les flèches grises représentent les séquences de reconnaissance des ATPases. Les rectangles bleus représentent les gènes des ATPases. Les boîtes -35, -10 et SD sont indiquées sur les régions.

forme SopA-ADP ou la forme SopA-libre est la forme répresseur. Dans la cellule, l'hydrolyse de l'ATP pourrait fournir la forme répresseur des ParA, car l'ATP est en plus grande quantité et l'affinité pour l'ATP est plus forte que pour l'ADP (Bouet et al., 2007; Bouet and Funnell, 1999)

Des mutations qui éliminent la capacité de ParA à fixer et à hydrolyser l'ATP causent des déficiences significatives dans l'autorégulation et la partition (Davis et al., 1996; Fung et al., 2001). D'autres mutations qui n'affectent que l'hydrolyse de l'ATP et non pas la fixation de l'ATP pour ParA de P1 et SopA de F, montrent que ces mutants ne sont déficients que pour la partition mais deviennent des super-répresseurs de l'opéron *par* (Fung et al., 2001; Libante et al., 2001). *In vitro* l'activité de fixation spécifique à l'ADN de ces mutants de ParA de P1, reste dépendante des nucléotides, mais l'ATP et l'ADP sont d'aussi bon co-facteurs. Ces mutants agissent comme s'ils adoptaient la forme ParA-ADP quelque soit le nucléotide fixé. Ces données suggèrent l'hypothèse que l'hydrolyse de l'ATP est nécessaire pour la partition.

In vivo, ParB/SopB augmente fortement la répression transcriptionnelle de ParA/SopA (Friedman and Austin, 1988; Hirano et al., 1998), et *in vitro*, ParB/SopB stimule la fixation de ParA/SopA à leur région opératrice (Davey and Funnell, 1997; Mori et al., 1989). Des expériences d'empreinte à la DNaseI indiquent que ParB stimule l'activité de fixation spécifique à l'ADN de ParA en présence d'ATP seulement (Davey and Funnell, 1997). L'affinité de ParA pour *parOP* en présence de ParB et de l'ATP est la même que son affinité pour *parOP* en présence d'ADP ou ATP γ S (Davey and Funnell, 1997). D'autre part ParB stimule l'hydrolyse de l'ATP de ParA. Ces observations suggèrent que l'activité co-répresseur de ParB empêche ou annule les effets inhibiteurs de l'hydrolyse de l'ATP sur l'activité de fixation spécifique à l'ADN de ParA, en fournissant par exemple une quantité plus importante de la forme Par-ADP. *In vivo*, l'activité répresseur des mutants de ParA super-répresseur est insensible à la stimulation de ParB et l'activité de répression de ces mutants est la même que celle de ParA stimulée par ParB (Fung et al., 2001). Ces résultats *in vitro* et *in vivo* impliquent que la fonction de ParB est de convertir ParA en sa forme répresseur. *In vivo*, les sites centromériques *parS/sopC* agissent aussi comme des co-répresseurs des promoteurs *par* de manière dépendante de ParB/SopB. Les délétions de *parS/sopC* conduisent à une augmentation de la transcription de l'opéron *par*. *parS/sopC* agissent aussi comme co-répresseur en *trans*, ce qui implique que la répression transcriptionnelle n'est pas une conséquence du « spreading » de ParB/SopB sur leur site centromérique (Hao and Yarmolinsky, 2002; Yates et al., 1999). Ces données suggèrent que le complexe de partition est impliqué dans l'activité répresseur de la protéine ParA/SopA. Ils pourraient convertir

plus activement ParA-ATP en sa forme répresseur ParA-ADP.

3.B.3 Les protéines ParA interagissent avec le complexe de partition

Plusieurs expériences sur différents loci de partition évoquent la possibilité que les ATPases à Walker box doivent jouer un rôle dans la séparation des plasmides appariés au niveau de leur site centromérique. Des expériences *in vitro* montrent que pour le système P1, en présence d'ATP, ParA se fixe au complexe de partition composé de ParB et de IHF fixé sur *parS*, si le rapport ParB/ParA est élevé (Bouet and Funnell, 1999). A l'inverse, avec un rapport ParA/ParB élevé, ParA déstabilise le complexe de partition formé sur *parS*. Des observations similaires ont été faites pour le locus de partition de type Ib du plasmide TP228 (Barilla and Hayes, 2003). Il a été montré également qu'un excès de SopA (F) entraînait la diminution du nombre de supertours positifs induits par la fixation de SopB sur *sopC*, suggérant que SopA perturbe la formation du complexe de partition (Lemonnier et al., 2000). L'effet de SopA semble nécessiter la fixation de l'ATP et/ou l'hydrolyse de l'ATP, car une protéine SopA mutante portant une substitution au niveau d'une lysine conservée dans le site de fixation de l'ATP, n'a plus d'effet sur la topologie du plasmide F. Ce mutant de SopA, déficient pour l'hydrolyse de l'ATP induit une hyper-instabilité du plasmide F. Une des explications possibles est que le mutant de SopA ne peut plus séparer les plasmides appariés par l'intermédiaire de l'interaction SopB-*sopC*. Les plasmides ne ségrègent plus en unité indépendante et sont répartis aléatoirement par bloc de plasmides, ce qui conduit à une perte du plasmide supérieure à la perte aléatoire. Une substitution dans le motif Walker box A de ParA de P1 confère aussi ce phénotype d'hyper-instabilité (Fung et al., 2001).

D'autres éléments provenant d'études cytologiques soutiennent l'hypothèse que les ATPases de type I assurent la fonction de séparation des plasmides au cours de la partition. Dans le cas du plasmide P1, l'absence de ParA conduit à la diminution du nombre de cellules contenant un focus de plasmides au centre de la cellule, et les foci localisés au centre des cellules, sont incapables de se séparer avant la division cellulaire (Li et al., 2004). Une autre étude chez le plasmide pB171 montre qu'une mutation dans le motif Walker box A de ParA, confère un phénotype d'instabilité (Ebersbach and Gerdes, 2004). La protéine mutante participe toujours à la localisation centrale des foci plasmidiques dans les cellules, mais n'est plus capable de séparer les plasmides ce qui conduit au phénotype d'instabilité.

Toutes ces données convergent vers l'idée que la fonction ATPase des protéines ParA, que ce soit la fixation de l'ATP ou encore l'hydrolyse, est importante pour le

mécanisme de partition. Il semblerait que les diverses conformations adoptées par les protéines ParA selon les nucléotides fixés ou non, donnent aux protéines des fonctions différentes. Pour le système de partition du plasmide P1 un modèle a été proposé, selon lequel l'hydrolyse de l'ATP pourrait être un interrupteur moléculaire qui dirigerait la forme Par-ATP dans la voie de la partition et la forme ParA-ADP dans la voie de la répression (Figure 24 [Bouet and Funnell 1999](#)). Dans la cellule, la majorité des molécules de ParA serait complexée à l'ATP et non à l'ADP au vue de la concentration plus importante d'ATP dans la cellule et de l'affinité plus grande que possède ParA avec l'ATP. Cette conformation de ParA serait principalement recrutée au complexe de partition par l'intermédiaire de l'interaction ParA-ParB. La forme ParA-ADP serait majoritairement produite par l'hydrolyse de l'ATP stimulée par ParB et par l'ADN et aussi par la fixation transitoire de ParA à l'ADP. Dans cette conformation ParA serait alors dirigée vers la répression du promoteur *parOP*. L'effet de ParB observé sur la stimulation de la répression pourrait s'expliquer par le fait que ParB stimule aussi l'activité ATPase de ParA et donc potentialise la forme ParA-ADP. Seules les molécules ParA-ATP interagiraient donc avec le complexe de partition afin de réaliser la séparation des plasmides. Ce dernier mécanisme de la partition n'est toujours pas compris actuellement.

3.B.4 Le comportement dynamique de ParA

Plusieurs études ont montré que les ATPases de type I ont un comportement dynamique *in vivo* et *in vitro*. *In vivo*, certaines protéines ParA sont capables d'osciller d'un pôle à l'autre dans la cellule. *In vitro*, les protéines ParA forment comme ParM des polymères. Ces deux observations ont conduit à la prédiction de deux modèles pour le mécanisme de séparation des plasmides. Le modèle de « réaction diffusion », proposé par Hunding et collaborateur, est basé sur l'oscillation de ParA ([Hunding et al., 2003](#)). La principale idée de ce modèle est qu'une forme (at) de la protéine est libre de diffuser dans le cytoplasme (Figure 25). Cette forme s'oligomérisse (AT) et fixe un substrat. La formation de AT est autocatalytique et la dégradation de cette forme conduit à une forme de la protéine (ad) incapable de se fixer au substrat. Les formes ad et at diffusent plus rapidement que la forme AT. Dans ce modèle, ParB induit une autre forme (AD) à partir de AT et le produit de dégradation AD s'auto-initie en se propageant aux sites AT voisins. Le produit de dégradation AD est ensuite convertit en ad. On peut envisager que la forme diffusible at est représentée par ParA-ATP. ParA-ATP s'oligomérisse et fixe alors le nucléoïde (AT). La conversion de la forme AT en forme AD, induite par ParB, peut être interprétée par la stimulation de l'activité ATPase de ParA et probablement par la formation d'oligomère ParA-ADP. La conversion de AT en AD serait alors le moteur de l'oscil-

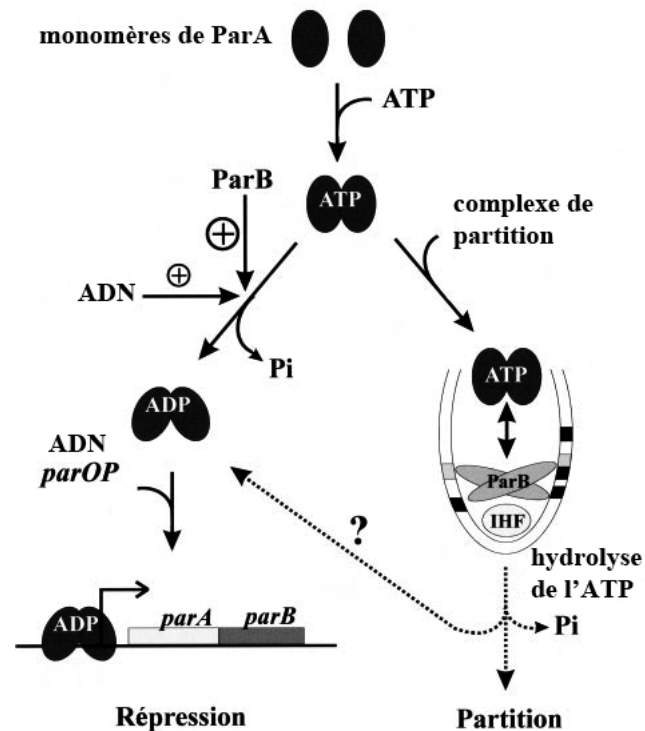


Figure 24 – Le modèle décrit le contrôle des activités de ParA par la fixation des nucléotides d'adénines

La fixation de l'ATP ou de l'ADP active la dimérisation de ParA. Dans la voie de droite, la conformation de ParA-ATP agit préférentiellement avec le complexe de partition formé par ParB et IHF fixé sur *parS*. Une fois recruté par ParB, ParA participerait à la dernière étape du mécanisme de partition qui nécessiterait l'hydrolyse de l'ATP. Dans la voie de gauche, l'hydrolyse de l'ATP, stimulée par ParB et l'ADN convertit ParA à sa forme répresseur ParA-ADP qui agit sur la répression de *parOP*. Les formes ParA-ADP pourraient aussi provenir de l'activité d'hydrolyse effectuée par la voie de droite. (D'après Bouet and Funnell 1999.)

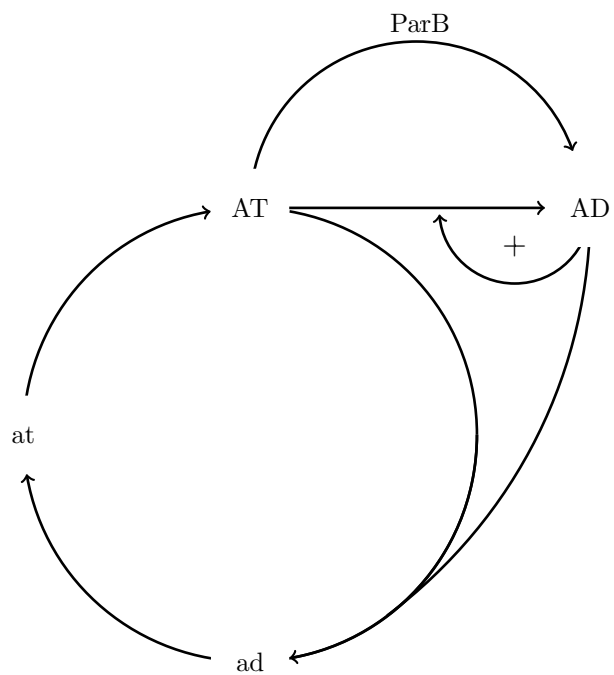


Figure 25 – **Représentation schématique du mécanisme de réaction diffusion**

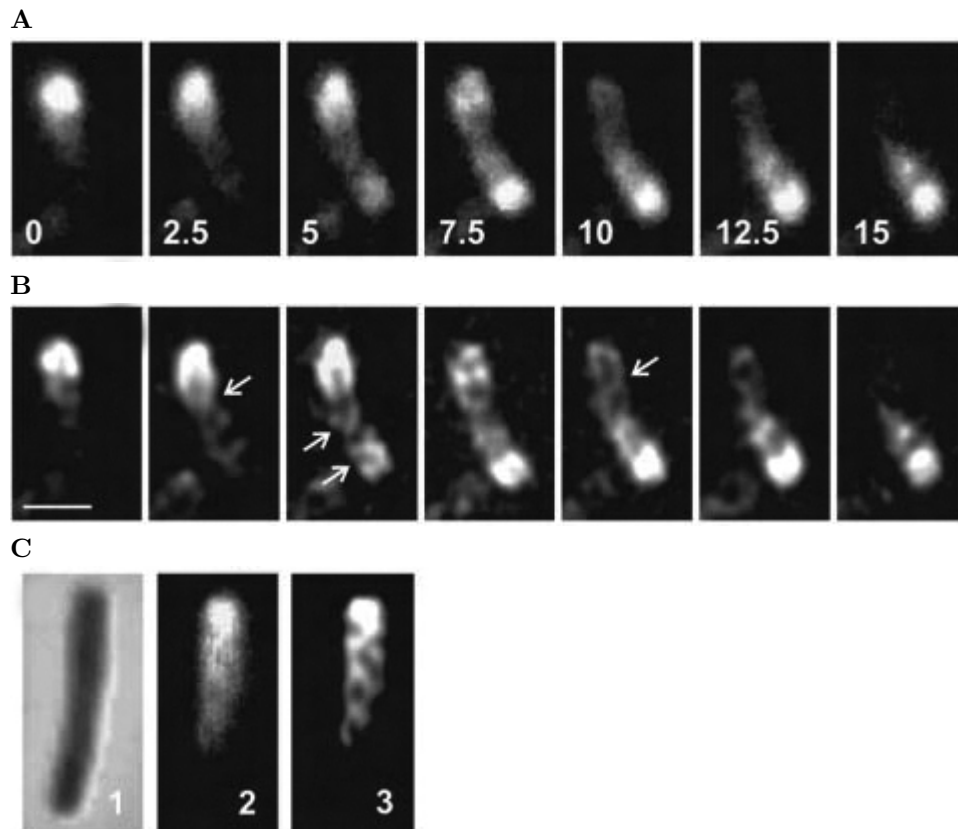


Figure 26 – Oscillation et structure hélicoïdale de ParA de pB171

A) Images suivies pendant 15 min de ParA-GFP de pB171 exprimé à partir d'un plasmide ($par2^+$, $plac :: parA :: gfp$) dans une cellule. B) Les images de A sont soumises à un programme de déconvolution 2D. Les flèches montrent les croisements des structures fluorescentes ou les structures hélicoïdales. C) Les cellules portant un plasmide ($par2^+ \Delta parA plac :: parA :: gfp$) exprimant ParA-GFP sont fixées et une série d'images sont prises en fonction de l'axe Z de la cellule. C-1 représente une image en contraste de phase soulignant les contours d'une cellule, C-2 est une image représentant la superposition de toutes les images prises selon l'axe Z et C-3 représente les images de C2 soumises à un programme de déconvolution 3D. L'utilisation d'images effectuées sur plusieurs plans favorise la visualisation de la structure hélicoïdale que dessine ParA-GFP lors de son déplacement. (D'après Ebersbach and Gerdes 2004.)

lation de ParA. La forme AD dépolymérise ensuite en ad qui peut être représentée par ParA-ADP ou ParA qui diffuse rapidement et fixe à nouveau de l'ATP.

Le modèle « pulling/pushing », conceptuel pour le déplacement des réplicons est soutenu par le système de type II du plasmide R1 où les filaments de ParM polymérise entre deux plasmides R1 pour les pousser à chaque pôle de la cellule.

3.B.4.a L'oscillation de ParA

L'ATPase de type Ib Soj, codée par le chromosome de *B. subtilis* décrit un mouvement dynamique *in vivo*, qui se traduit par une oscillation de la protéine sur le nucléoïde (Marston and Errington, 1999; Quisel et al., 1999). L'oscillation de Soj est dépendante de Spo0J et probablement du site centromérique *parS*. En absence de Spo0J, Soj se localise de manière non spécifique sur le nucléoïde. Cependant une étude récente a montré que dans des conditions d'expression de la protéine Soj à des niveaux se rapprochant du niveau physiologique, la protéine ne possède plus de comportement oscillatoire, mais forme des foci tout au long du cytoplasme en présence de Spo0J (Murray and Errington, 2008). Les premières études sur le comportement oscillatoire des protéines ParA plasmidique *in vivo*, ont été faites sur le système de partition *par₂* du plasmide pB171 (Ebersbach and Gerdes, 2001, 2004). Les auteurs ont montré que la protéine ParA de ce système, fusionnée à la protéine fluorescente GFP, oscille sur la région du nucléoïde plusieurs fois durant le cycle cellulaire. L'oscillation, dépendante de ParB et de *parC*, décrit un mouvement en forme de spirale (Figure 26). Lorsque ParB est absent, cette structure hélicoïdale est figée sur toute la longueur du nucléoïde. Ces données indiquent que le complexe de partition régule les propriétés dynamiques de ParA. ParB et *parC* sont aussi nécessaires à l'activité ATPase de ParA et le comportement dynamique de ParA est certainement dépendant de la régulation de son activité ATPase. En effet, il a été montré récemment que l'oscillation de ParA n'est plus observée en présence d'un mutant de ParB (ParB^{26A}) qui ne stimule plus l'activité ATPase de ParA (Ringgaard et al., 2009). Une mutation d'un résidu conservé dans le motif Walker box de ParA montre une corrélation entre l'oscillation de ParA et la stabilité des plasmides, suggérant un rôle de l'oscillation de ParA dans la ségrégation des plasmides (Ebersbach and Gerdes, 2001).

De manière similaire, SopA a un comportement dynamique *in vivo* et oscille sur le nucléoïde dans les cellules (Adachi et al., 2006; Hatano et al., 2007; Lim et al., 2005). SopA forme un amas, localisé près d'un pôle des cellules. Au cours du temps, cet amas disparaît du pôle et réapparaît au pôle opposé de la cellule. L'oscillation de SopA est dépendante de son activité ATPase (Hatano et al., 2007). Des mutants de SopA déficients pour leur activité ATPase ne forment plus d'amas et se localisent

uniformément sur le nucléoïde. Les analyses de Adachi et collaborateurs indiquent que l'oscillation de SopA décrit un mouvement hélicoïdal dans la cellule dépendant de SopB et de *sopC* (Adachi et al., 2006). SopB forme des foci qui colocalisent avec le plasmide F. Cependant, une petite partie de SopB décrit un mouvement oscillatoire dans la cellule (Adachi et al., 2006). Ce mouvement est dépendant de SopA et succède au flux de SopA dans la cellule. En absence de SopA, SopB reste localisée sur le plasmide F. Les auteurs suggèrent que l'oscillation de SopA recruterait et déplacerait SopB (Figure 27). Ce modèle de partition dit de « réaction-diffusion » suggère que SopA dispose SopB de manière statistique et ordonnée dans la cellule. Cette action pourrait créer un nombre limité de zones où SopB est concentré (foci), permettant la fixation des plasmides F porteur de *sopC*. Les plasmides seraient ainsi localisés en fonction du déplacement des protéines SopB dépendant de SopA. Une étude sur le suivi par des expériences de time lapse à la fois du plasmide F et de SopA montre que le plasmide F semble migrer vers l'amas de SopA (Hatano et al., 2007). L'oscillation de SopA permettrait le déplacement du plasmide F au cours du cycle cellulaire de part et d'autre de l'axe de la cellule (Figure 28A-B). Après la réplication du plasmide, un des deux plasmides reste d'un côté de la cellule, et l'autre plasmide suit le focus de SopA de l'autre côté de la cellule (Figure 28C). D'après les auteurs, les plasmides appariés seraient séparés grâce à la déstabilisation du complexe étendu SopB-ADN non spécifique par SopA (Lemonnier et al., 2000). Ensuite le complexe de partition se reformerait et un seul des deux plasmides frère serait pris en charge par SopA. Les études précédentes qui montrent qu'un plasmide F est localisé au centre des cellules, suggéraient que le plasmide pouvait être fixé à cette position (Gordon et al., 1997; Niki and Hiraga, 1997). Ici, les auteurs démontrent, par des expériences de time lapse, que la localisation du plasmide au centre de la cellule est un positionnement moyen dû à sa réorientation et à ses déplacements successifs (Figure 28B2).

L'oscillation de SopA est compatible avec le modèle de réaction diffusion proposé par Adachi et collaborateur. Néanmoins, ce modèle ne permet pas d'expliquer les changements de direction du mouvement des plasmides F dus à l'oscillation de SopA, observé par Hatano et collaborateur. Ces derniers proposent que la déstabilisation du complexe de partition par SopA serait à l'origine de la séparation des plasmides et que SopA prendrait ensuite en charge un des plasmides pour le placer à une position opposée de l'autre. Cependant, à cause du mouvement continu de SopA, il n'est pas exclu que les plasmides s'apparient à nouveau par la suite. La clé de cette étape de la partition pourrait provenir de la formation des polymères.

3.B.4.b Les polymères de ParA

Comme pour ParM, des polymères formés par des protéines ParA de type I ont été observés *in vitro*. Les premières observations ont été faites sur le système de partition de type Ib du plasmide pT228 (Barillà et al., 2005). L'ATPase ParF forme des polymères en présence d'ATP et d'ATP γ S suggérant que l'hydrolyse de l'ATP n'est pas nécessaire pour la formation des polymères. En ME, ces polymères sont représentés sous forme de filaments de 400 à 650 nm de long et de 30 à 70 nm de large (Figure 29D). ParG intervient également dans la formation des polymères. Un rapport ParG/ParF faible potentialise la formation des polymères. Dans ces conditions, les polymères peuvent atteindre des longueurs supérieures à 1 μ m et des largeurs supérieures à 70 nm. En revanche un rapport ParG/ParF élevé atténue la formation des polymères.

ParA de pB171 forme aussi des polymères *in vitro* (Ebersbach et al., 2006) (Figure 29A). La polymérisation est ATP dépendant et n'a pas lieu en présence d'ATP γ S. Ceci indique que soit l'hydrolyse de l'ATP est nécessaire pour la formation des polymères, soit la conformation adoptée par ParA en présence d'ATP γ S ne permet pas l'assemblage des polymères. En ME, ces polymères ont une forme différente de ceux de ParF. Ils sont plus fins, plus longs, et s'assemblent entre eux pour former des paquets de filaments. Les auteurs suggèrent que l'activité ATPase pourrait être nécessaire à la régulation de cette polymérisation qui se traduirait *in vivo* par l'oscillation de ParA.

Des études sur les ATPases ParA2 et Soj, codées respectivement par le chromosome 2 de *V. Cholerae* et le chromosome de *Thermus thermophilus*, ont montré que ces ATPases sont aussi capables de s'assembler sous forme de polymères *in vitro* (Hui et al., 2010; Leonard et al., 2005) (Figure 30 et 31). Contrairement aux ParA plasmidiques, la polymérisation de ces deux ATPases est strictement dépendante de l'ADN, et pour cette activité l'ATP n'est essentielle que pour Soj. ParA2 forme des polymères en absence de nucléotides ou en présence d'ADP ou d'ATP. Cependant, les filaments formés par ParA2 en présence d'ATP semblent plus réguliers et plus épais que ceux formés avec l'ADP ou sans nucléotides. Cette impression est confirmée par la reconstruction tri-dimensionnelle des filaments qui montre que les filaments formés avec l'ATP sont constitués de 4,4 sous-unités par tour avec un pas d'hélice de 120 Å, alors que ceux formés par l'ADP ou sans nucléotides sont constitués de 4,1 sous unités par tour avec un pas d'hélice de 204 Å (Figure 30). Les images obtenues pour les filaments de Soj semblent indiquer une structure des filaments régulière et peut-être hélicoïdale.

ParA2 de *V. Cholerae* est l'ATPase chromosomique le plus proche des ATPases plasmidique de type Ia (Yamaichi and Niki, 2000). Pourtant une étude sur SopA

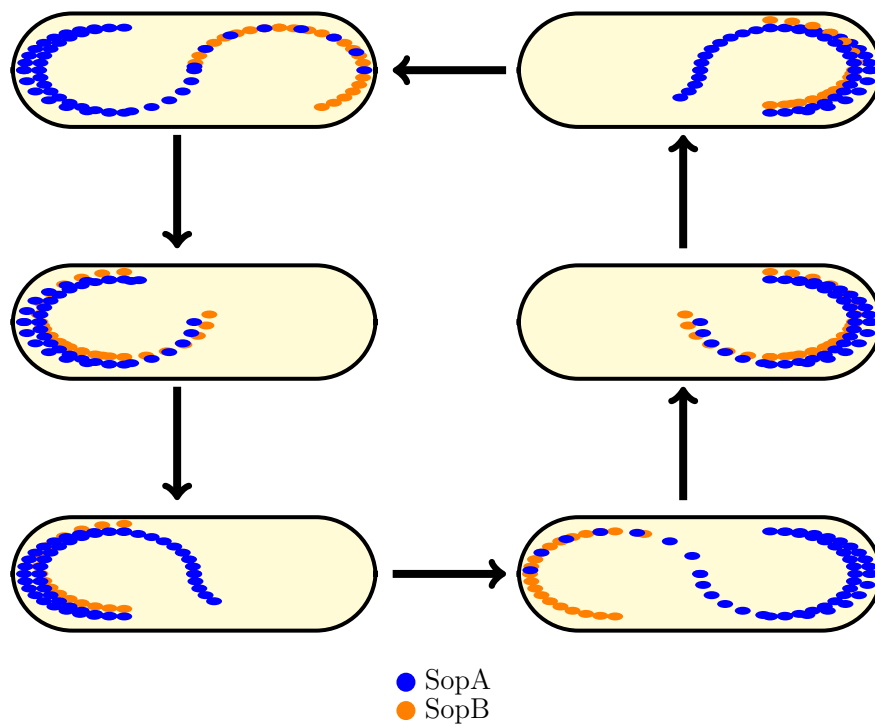


Figure 27 – **Modèle pour l'oscillation de SopA et de SopB**
SopA (bleu) décrit des mouvement oscillatoire dans la cellule en présence de SopB(orange) et de *sopC*. Une partie de SopB est recrutée par SopA et succède au flux de SopA dans la cellule. (D'après Adachi et al. 2006.)

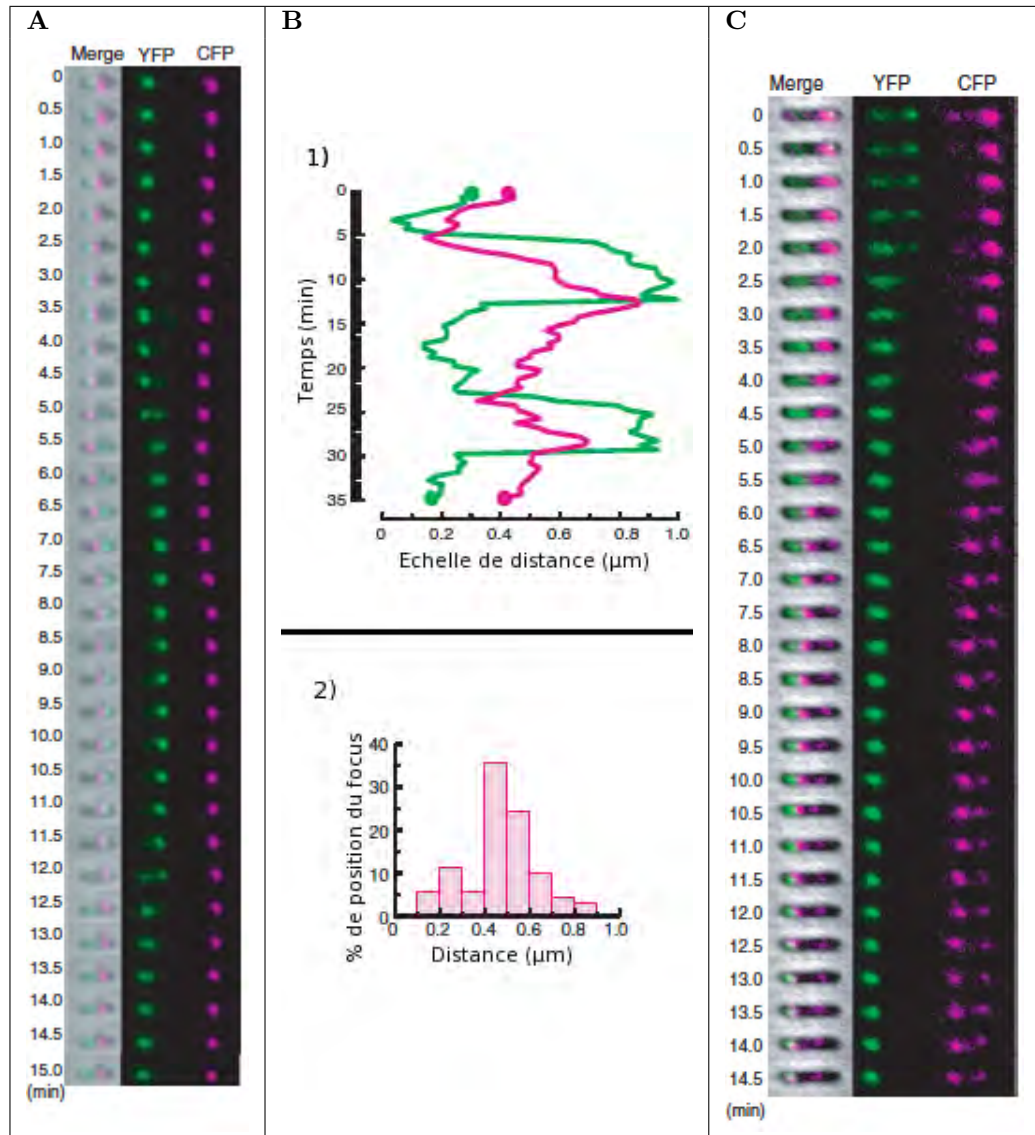


Figure 28 – Analyse des mouvements de SopA et du plasmide F

A) Images suivies pendant 15 min de SopA-YFP (vert) et de LacI-CFP (magenta) localisant un focus de plasmides mini-F. B-1) Diagramme représentant les mouvements de SopA-YFP et de LacI-CFP dans la cellule au cours du temps. B-2) Position moyenne de LacI-CFP dans les cellules. C) Images suivies dans le temps pendant 14,5 min de SopA-YFP (vert) et de LacI-CFP (magenta) localisant de foci de plasmides mini-F. (D'après Hatano et al. 2007.)

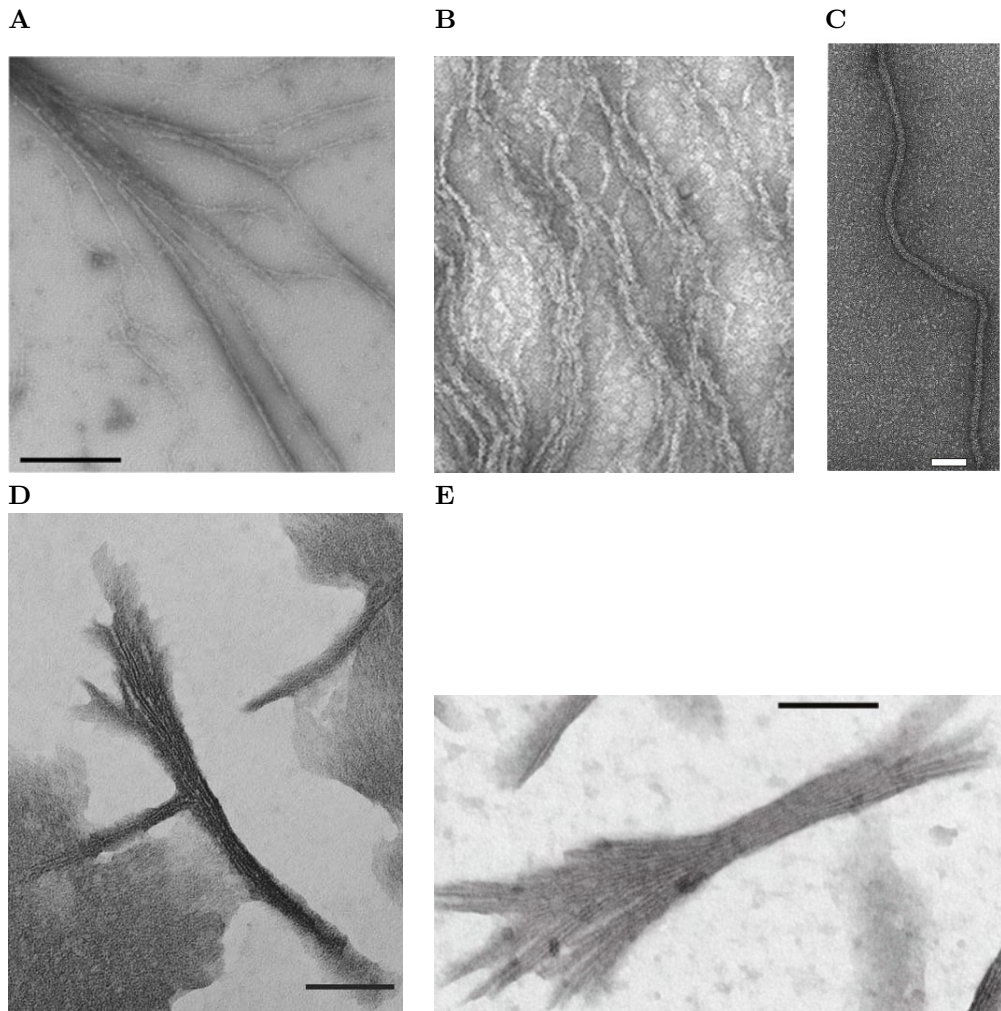


Figure 29 – **Filament de ParA plasmidique en présence d'ATP**
Les protéines ParA des plasmides pB171 (A), P1 (B), pSM19035 (C), pTP228 (D) et F (E) forment des filaments *in vitro* en présence d'ATP. Les filaments δ_2 (ParA) de pSM19035 se forme sur l'ADN (C). La barre de A représente 500 nm, la barre de C 50 nm et les barres de D et E 100 nm (Extrait de Barilla et al. 2005; Bouet et al. 2007; Dunham et al. 2009; Ebersbach et al. 2006; Pratto et al. 2008.)

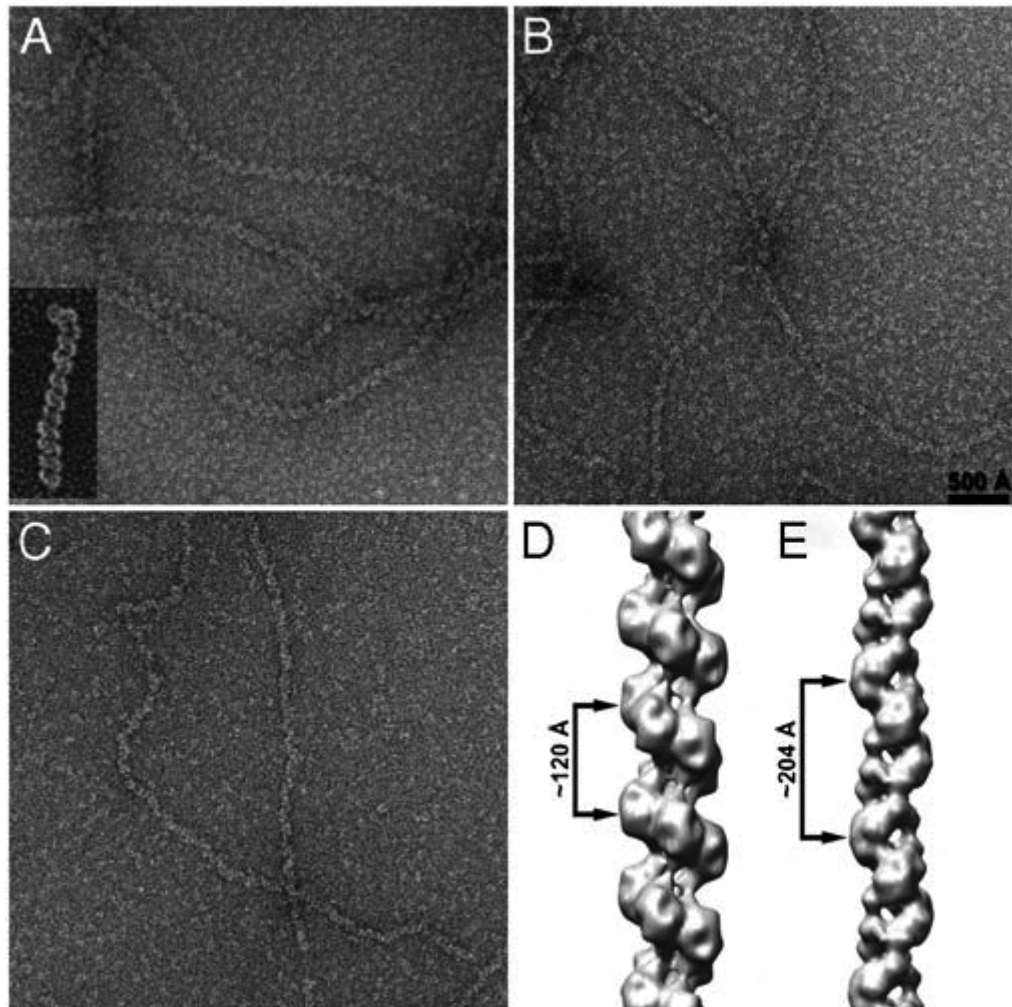


Figure 30 – Filament de ParA₂ du chromosome 2 de *Vibrio cholerae*
Image de ME en coloration négative de filaments ParA₂ sur l'ADN double brin en présence d'ATP (A), d'ADP (B) ou sans nucléotide (C). La barre en B représente 500 Å et s'applique aux images A à C. D et E représentent des reconstructions tridimensionnelle des filaments de ParA₂ formés sur l'ADN en présence d'ATP (D) ou d'ADP (E). (Extrait de Hui et al. 2010.)

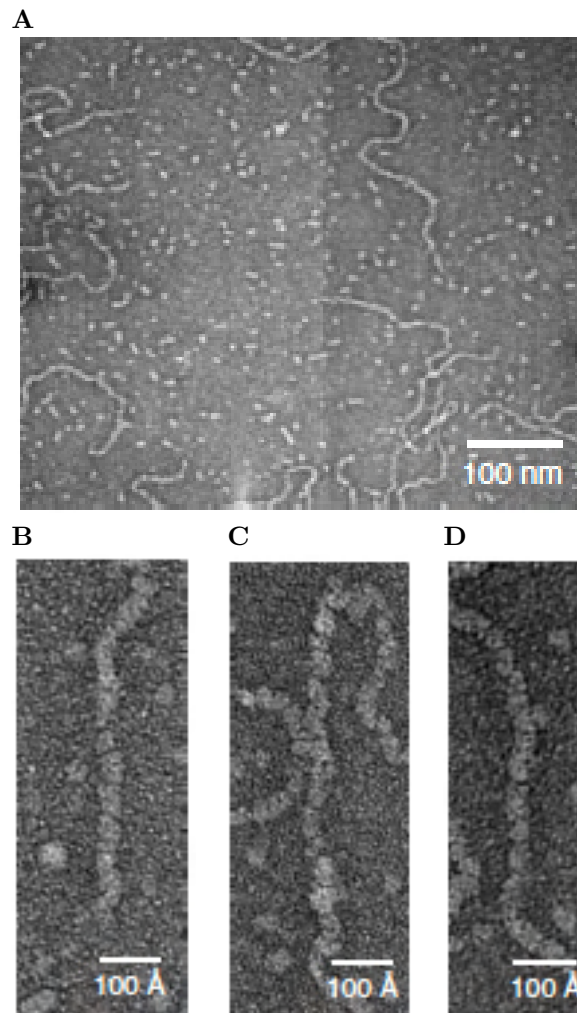


Figure 31 – **Filament de Soj du chromosome *Thermus thermophilus***
Image de ME en coloration négative de filaments Soj sur l'ADN d'un plasmide linéarisé en présence d'ATP (A-D). (B-D) Les images à fort grossissement des filaments indiquent une disposition régulière et peut-être hélicoïdale des filaments. (Extrait de Leonard et al. 2005.)

(F), une des ATPases la plus représentative des types Ia plasmidiques, montre des caractéristiques de polymérisation différentes (Bouet et al., 2007). SopA forme aussi des polymères *in vitro* (Figure 29E). Cette activité est strictement dépendante de l'ATP et est stimulée par SopB. Les observations en ME montrent des structures fibreuses organisées en paquet de filaments de 200 à 500 nm de long et de 10 à 40 nm de large. L'apparence des filaments est similaire à ceux de ParF (Barilla et al., 2005) et aucune structure hélicoïdale n'a été observée. Des expériences de dynamique light scattering (DLS) révèlent que la vitesse de polymérisation est proportionnelle à la concentration de SopA. Au cours du temps la polymérisation atteint un état d'équilibre qui traduit des événements de cassures et de liaisons des polymères, avec des structures pouvant mesurer 1 μm . Contrairement aux ATPases ParA2 et Soj, l'ADN inhibe la polymérisation de SopA et désassemble des polymères pré-formés. En effet, en présence d'ATP, SopA possède aussi une activité de fixation non-spécifique à l'ADN (Bouet et al., 2007). *In vivo* au vu de la présence importante de l'ADN dans la cellule, les polymères de SopA doivent être inhibés. Cependant des études ont montré que SopA pouvait former des structures fibreuses *in vivo* (Hatano et al., 2007; Lim et al., 2005). *In vitro*, SopB est capable de promouvoir la polymérisation de SopA en présence d'ADN (Bouet et al., 2007). Les auteurs ont montré que par son activité de fixation à l'ADN, SopB peut recouvrir et masquer l'ADN. Ne pouvant plus se fixer à l'ADN masqué par SopB, SopA-ATP peut former des polymères. En se basant sur ces données, les auteurs ont proposé un modèle pour la séparation des plasmides (Figure 32). Ce modèle se base sur l'hypothèse que SopA serait capable de séparer les complexes de partition par l'intermédiaire des polymères. La formation des polymères est inhibée par l'ADN et de ce fait, les polymères ne peuvent se former librement dans la cellule car l'ADN est constamment présent. Une fois que la répllication des plasmides est réalisée, SopB se fixe sur *sopC* pour former le complexe de partition. Par son activité de liaison à l'ADN non spécifique, SopB aurait la capacité de s'étaler sur l'ADN autour de *sopC* en *cis* et/ou en *trans*. Cette activité permet à SopB de masquer l'ADN et donc de créer une zone où tout contact avec l'ADN est absent. Par conséquent, SopA-ATP, stimulée par SopB, peut s'assembler dans cette zone et former rapidement des polymères. Ces polymères pourraient être les acteurs de la dernière étape de la partition et promouvoir la séparation des plasmides. L'inhibition de la polymérisation par l'ADN serait d'une part un point de contrôle qui permet de prévenir la formation des polymères et donc d'empêcher la séparation précoce des plasmides et d'autre part l'évènement qui permettrait la cassure des filaments après la séparation des plasmides.

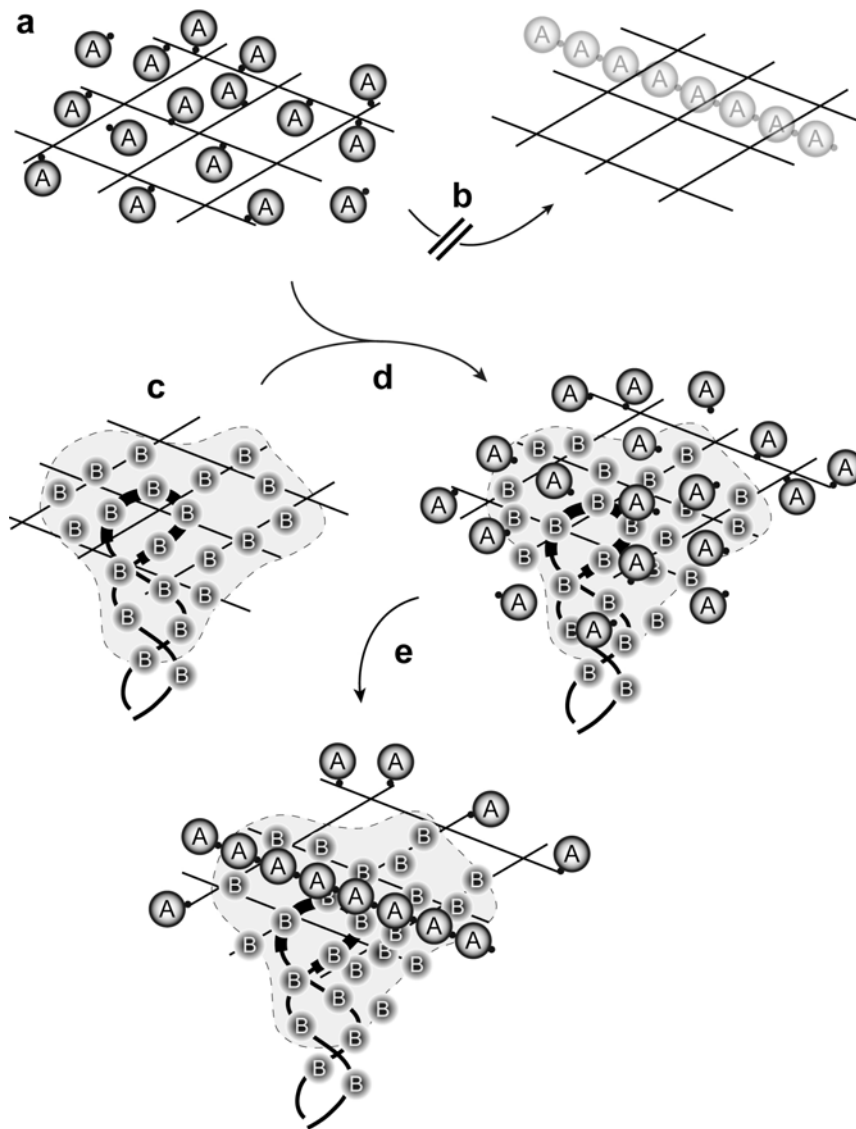


Figure 32 – **Modèle pour l'initiation des polymères de SopA *in vivo***

a) SopA-ATP (sphère A) se fixe au nucléoïde (lignes croisées) de manière réversible par son domaine d'interaction à l'ADN. b) La fixation au nucléoïde inhibe la polymérisation. c) Lorsque le plasmide F (lignes courbées) est présent, SopB (sphère B) se fixe à *sopC* (trait épais sur la courbe) et ce complexe favorise l'extension de SopB sur l'ADN adjacent (plasmide F et nucléoïde) créant ainsi une zone où l'ADN est masqué (zone ombré). d) Les protéines SopA-ATP libre rencontre cette zone où aucun contact avec l'ADN n'est possible. e) Dans cette zone, les protéines SopA-ATP vont s'assembler pour former le polymère. (Extrait de Bouet et al. 2007.)

3.B.4.c Le rôle de l'activité ATPase dans la partition

Il semblerait que l'assemblage des polymères ne nécessite pas l'hydrolyse de l'ATP et encore moins sa stimulation par SopB et l'ADN. En effet, SopB et l'ADN stimulent d'un facteur d'au moins vingt cinq l'hydrolyse de l'ATP et d'après les propriétés de la stimulation de l'activité ATPase de SopA, il est couramment admis que SopB complexé à l'ADN est l'élément activateur de l'hydrolyse de l'ATP. Or un peptide DT1 qui se fixe à l'ADN permet également la polymérisation de SopA en présence d'ADN (Bouet et al., 2007). Ces données indiquent que d'une part le masquage de l'ADN désinhibe la formation des polymères et d'autre part que la stimulation de l'activité ATPase de SopA n'est pas à l'origine de sa polymérisation. De plus un mutant de SopA (SopA-K340A) qui n'est plus stimulé pour l'hydrolyse de l'ATP (Castaing et al., 2008) et un mutant de SopA (SopA-D145A) déficient pour l'hydrolyse de l'ATP (Castaing, Lane, Bouet données non publiées) sont toujours capables de former des polymères. Ceci suggère que l'activité d'hydrolyse de l'ATP de SopA n'est pas à l'origine des polymères. En revanche l'activité d'hydrolyse de l'ATP de SopA pourraient jouer un rôle dans le désassemblage des polymères.

La découverte de l'activité de fixation non spécifique à l'ADN de SopA en présence d'ATP a posé la question du mécanisme d'activation de l'ATPase par SopB et l'ADN. En effet, si SopA est capable de se fixer à l'ADN de manière non spécifique en présence d'ATP et que l'hydrolyse de l'ATP est stimulée par SopB et l'ADN, qui de SopA ou de SopB contacte l'ADN pour la stimulation de l'activité ATPase de SopA ? Du fait de l'importance de l'activité ATPase dans la partition, il est nécessaire de comprendre quelles sont les contacts moléculaires impliquées dans cette activité. C'est dans ce contexte que s'inscrivent mes travaux de thèse. Quelles sont les interactions nécessaires à SopA pour l'hydrolyse de l'ATP, et quel est le rôle de la stimulation de l'hydrolyse de l'ATP *in vivo*, sont les questions auxquelles j'ai essayé de répondre au cours de ma thèse.

Deuxième partie

Résultats

Afin de comprendre le mécanisme de partition chez les bactéries, nous étudions comme modèle au laboratoire le système de partition de type Ia du plasmide F chez *E. coli*. Ce système appelé sop pour « Stability Of Plasmid » est composé d'un site centromérique *sopC* et de deux gènes organisés en opéron qui codent les protéines de partition SopA et SopB (Figure 7). SopB est la protéine de liaison à l'ADN et reconnaît spécifiquement *sopC* pour former le complexe de partition. SopA est l'ATPase du système et possède plusieurs activités. Elle est capable d'hydrolyser l'ATP, d'autoréguler son promoteur et possède un comportement dynamique dans la cellule bactérienne. Au cours de ma thèse, je me suis intéressé aux activités de SopA par des approches moléculaires et biochimiques. Ce travail s'est déroulé en trois parties. Dans un premier temps, j'ai participé à des travaux sur la régulation de la polymérisation de SopA et la caractérisation de ses polymères. Nous avons montré que comme pour les ATPases ParF et ParA du système de partition des plasmides pTP228 et pB171, SopA est aussi capable de former des polymères *in vitro*. La formation de ces polymères est régulée par SopB et par l'ADN. Nous avons aussi mis en évidence que SopA possède une activité de liaison non spécifique à l'ADN en présence d'ATP. Cette activité fut découverte ici pour la première fois pour un système de partition plasmidique de type Ia. Par la suite j'ai essayé de caractériser ces polymères de SopA *in vitro* en présence de SopB et de l'ADN. Cette étude nous a permis de proposer un modèle sur la séparation des plasmides par les polymères de SopA. Ces travaux sont présentés dans la première partie de mes résultats. Je me suis intéressé ensuite à la régulation de l'activité ATPase de SopA. Ces travaux ont permis de montrer que pour l'activation de l'hydrolyse de l'ATP, SopA interagit d'une part avec l'ADN et d'autre part avec SopB. Nous avons démontré aussi que SopB stimule l'activité ATPase de SopA grâce à un motif arginine finger et pour la première fois que le site centromérique *sopC* potentialise l'hydrolyse de l'ATP par l'intermédiaire de SopB. Ces travaux sont présentés dans la deuxième partie de mes résultats. Enfin dans la troisième partie, je présente les études que j'ai réalisées sur le rôle de la stimulation de l'activité ATPase de SopA *in vivo* où nous verrons que l'activation de l'ATPase est importante pour la régulation de l'opéron *SopAB* et aussi pour la partition.

Chapitre 1

La régulation de la polymérisation de SopA

SopA est une protéine complexe car elle possède de nombreuses activités : (i) c'est une ATPase ; (ii) elle se fixe de façon site-spécifique dans la région opératrice du promoteur *sop* permettant l'autorégulation de son expression ; (iii) elle interagit avec SopB, activant l'activité ATPase et la répression du promoteur *sop* et (iv) elle oscille dans le cytoplasme.

Pour mieux comprendre le rôle essentiel de SopA dans le processus de partition, nous avons purifié SopA sous forme native et testé SopA pour les activités connues ainsi que pour de nouvelles activités. Cette étude est présentée dans l'article ci-après.

SopA se fixe sur quatre séquences de 6 pb dans la région promotrice (*sopOP*) de l'opéron *sop* (Mori et al., 1989). Par des expériences de retard sur gel, nous avons montré que l'ADP améliore l'interaction avec *sopOP*, alors que l'ATP l'inhibe. Ces expériences indiquent que les nucléotides adénine régulent les activités de SopA. SopA et SopA-ADP sont les formes répresseurs de SopA.

SopA fixe l'ATP et l'ADP mais l'affinité de SopA est plus importante pour l'ATP que pour l'ADP (Watanabe et al., 1992). L'interaction SopA-ATP est très stable (demi-vie de 14 minutes). En revanche, la demi-vie de l'interaction SopA-ADP est très courte, inférieure à 30 secondes. Le turn-over après hydrolyse de l'ATP par SopA pourrait donc être très rapide et suggère que la forme SopA-ADP serait très peu présente dans la cellule. Nous avons montré que la stimulation de l'activité ATPase de SopA par SopB et l'ADN était quatre à cinq fois supérieure à celle initialement décrite (Watanabe et al., 1992) et que cette stimulation est dépendante de la concentration de SopA.

Notre étude indique que SopA est capable de former des complexes de haut poids moléculaire uniquement en présence d'ATP. Nous avons poursuivi l'analyse des complexes de haut poids moléculaire de SopA par leur observation en ME. SopA

est capable de former des filaments de grande taille, 300 à 600 nm, en présence d'ATP mais pas en présence d'ADP. La cinétique de formation des filaments de SopA a été étudiée par la technique de diffusion de lumière (« Dynamic Light Scattering »). Nous avons ainsi pu montrer (i) que les filaments ne peuvent se former qu'au dessus de la concentration critique de $1 \mu\text{M}$, (ii) que la vitesse de formation et la longueur des filaments sont proportionnelles à la concentration, (iii) que SopB active la formation des filaments de SopA mais uniquement au dessus de la concentration critique, (iv) que l'ADN inhibe la formation de ces filaments, et (iv) que SopB permet de masquer l'ADN inhibiteur.

Par la technique de rétention sur filtres, nous avons également montré dans cette étude que SopA, en plus de reconnaître spécifiquement la région opératrice de l'opéron *sop*, est capable de se fixer à l'ADN non-spécifiquement. Cependant, en présence d'ATP, cette activité est significativement augmentée d'un facteur quatre alors que la reconnaissance de l'opérateur est complètement abolie. Ceci suggère que la forme ATP a une meilleure affinité pour l'ADN non-spécifique et que SopA possède vraisemblablement un autre domaine de reconnaissance à l'ADN.

L'ensemble de ces données suggère que l'ADN et SopB sont des régulateurs de la formation des filaments et qu'*in vivo*, ils participent directement au contrôle de la polymérisation de SopA et donc du processus de partition. Nous pouvons envisager plusieurs modèles quant au rôle de ces filaments dans le processus de partition : (i) l'assemblage orienté des filaments et leur désassemblage pourrait être impliqué dans l'oscillation de SopA au sein du cytoplasme. Cependant, *in vitro* SopA est capable de former les filaments en l'absence des autres composants du système de partition. *In vivo*, le comportement dynamique de SopA n'est observable qu'en présence de SopB et du centromère *sopC* ; (ii) les filaments de SopA pourraient servir de « moteur » : après la reconnaissance des complexes de partition appariés, SopA pourrait polymériser en filament entre ces complexes afin de les pousser de part et d'autre aux positions $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$, centres des futures cellules filles.

1.A Présentation de l'article : « Polymerization of SopA partition ATPase : regulation by DNA binding and SopB »

Polymerization of SopA partition ATPase: regulation by DNA binding and SopB

Jean-Yves Bouet,^{1*} Yoan Ah-Seng,¹
Nacer Benmeradi² and David Lane¹

¹Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaire, UMR5100 CNRS, Toulouse, France.

²Institut d'Exploration Fonctionnelle des Génomes – Campus Paul Sabatier Toulouse III, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.

Summary

In bacteria, mitotic stability of plasmids and many chromosomes depends on replicon-specific systems which comprise a centromere, a centromere-binding protein and an ATPase. Dynamic self-assembly of the ATPase appears to enable active partition of replicon copies into cell-halves, but for most ATPases (the Walker-box type) the mechanism is unknown. Also unknown is how the host cell contributes to partition. We have examined the effects of non-sequence-specific DNA on *in vitro* self-assembly of the SopA partition ATPase of plasmid F. SopA underwent polymerization provided ATP was present. DNA inhibited this polymerization and caused breakdown of pre-formed polymers. Centromere-binding protein SopB counteracted DNA-mediated inhibition by itself binding to and masking the DNA, as well as by stimulating polymerization directly. The results suggest that *in vivo*, SopB smothers DNA by spreading from *sopC*, allowing SopA-ATP polymerization which initiates plasmid displacement. We propose that SopB and nucleoid DNA regulate SopA polymerization and hence partition.

Introduction

Mitotic segregation (partition) of low-copy number bacterial plasmids is governed entirely by two plasmid-specific proteins, generically termed ParA and ParB. Each protein forms a major complex which defines its role in partition. ParA is activated for partition by binding ATP. ParB binds to a specific centromere site to form a 'partition complex'. It is the interaction of ParA-ATP with partition complexes

that triggers and drives active displacement of plasmid siblings into the new cells-to-be. Despite significant recent progress (Ebersbach and Gerdes, 2005), the segregation mechanism is not understood at the molecular level. In the work reported here, we have focused on ParA-adenine nucleotide complexes and their implications for the partition mechanism, using as a model SopA, the ParA family protein of the *Escherichia coli* F plasmid.

ParA proteins are of two kinds. Those of the largest group, which includes SopA, carry motifs similar to those that characterize Walker-box ATPases (Motallebi-Veshareh *et al.*, 1990; Koonin, 1993). Proteins of the other group, typified by ParM of plasmid R1, belong to the actin family (Bork *et al.*, 1992). The Walker-box group is usefully subdivided (Gerdes *et al.*, 2000) into those, like SopA and ParA of plasmid P1, whose ATP-binding site (Walker A box) is preceded by a regulatory N-terminal domain and those like ParA of pB171 and ParF of TP228 which lack this domain. The latter subgroup includes all chromosomal ParA homologues, typified by Soj of *Bacillus subtilis*, and a number of other ATPases, notably the cell division regulator, MinD.

The integrity of the ATP-binding motif is necessary for ParA proteins to act in partition (Davis *et al.*, 1996; Jensen and Gerdes, 1997; Libante *et al.*, 2001). ATP hydrolysis by ParAs appears to be relevant to partition as it is stimulated moderately by the cognate ParB proteins and further stimulated by DNA (Davis *et al.*, 1992; Watanabe *et al.*, 1992; Jensen and Gerdes, 1997). However, action as a classic motor protein to transduce energy for active plasmid displacement (Williams and Thomas, 1992) has been viewed as unlikely, because the intrinsic ATP hydrolytic activity of ParAs is about a thousand-fold lower than that of typical Walker-box and actin-like ATPases. Moreover, hydrolysis is not the only result of ATP binding and ATP is not the only nucleotide to bind. ATP binding induces ParA proteins to dimerize (Davey and Funnell, 1994; Leonard *et al.*, 2005). Binding of ATP and of ADP induces distinct conformational changes in SopA and P1 ParA (Davey and Funnell, 1997; Libante *et al.*, 2001) with distinct functional consequences; P1 ParA-ADP binds more strongly to the *parA* promoter and is presumed to be the repressor, while only P1 ParA-ATP interacts with the ParB-*parS* partition complex, reflecting its role in partition (Bouet and Funnell, 1999). It appears thus that adenine nucleotides can act as cofactors to regulate activity of

Received 21 November, 2006. *For correspondence. E-mail: jean-yves.bouet@ibcg.biotoul.fr; Tel. (+33) 5 61 33 59 06; Fax: (+33) 5 61 33 58 86.

ParA proteins, and that binding and hydrolysis of ATP are functionally separable.

The discovery that ParA family proteins polymerize to form long filaments has shed light on the function of this dual response to ATP. The clearest example is the dynamic instability exhibited by the actin-like ParM (Moller-Jensen *et al.*, 2002; Garner *et al.*, 2004). Binding of ATP allows ParM to polymerize to form protofilaments which appear to be capped and stabilized by ParR-*parC* partition complexes and then lengthened by successive insertion of ParM-ATP at the filament-partition complex interface. Attached plasmids are thus pushed towards the cell poles. Walker-box ParA family proteins likewise form filaments in the presence of ATP (Hu *et al.*, 2002; Suefuiji *et al.*, 2002; Barilla *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2005). They also exhibit dynamic behaviour *in vivo* when the cognate partition complex is present, but it is expressed differently, as repeated amassing towards one end of the cell then the other (Marston and Errington, 1999; Quisel *et al.*, 1999; Ebersbach and Gerdes, 2001). How this oscillation is related to partition is unknown. In any case, the dual actions of ATP binding and ATP hydrolysis can be considered as the means by which a polymerization-depolymerization cycle is set up to bring about partition.

The nature of the partition complex needed to activate the ParA polymerization-depolymerization cycle has yet to be defined. It is unclear whether an extended complex formed by spreading of ParB from its core complex over neighbouring DNA (Biek and Strings, 1995; Lynch and Wang, 1995; Rodionov *et al.*, 1999) is involved in activating ParA and in partition, because the partition deficiency provoked by blocking the extension was modest (Rodionov and Yarmolinsky, 2004). It is also not certain that partition complex pairing observed *in vitro* (Jensen *et al.*, 1998) and *in vivo* (Edgar *et al.*, 2001) is normally needed to ensure bidirectionality of segregation, as generally supposed. P1 ParA can interact with a single ParB-*parS* partition complex *in vivo* (Edgar *et al.*, 2006), and stabilization of ParM protofilaments by ParR-*parC* complexes suggests that simple proximity of complexes could suffice for the ensuing polymerization (Garner *et al.*, 2004).

A further outstanding issue is the role played by non-specific, nucleoid DNA in ParA dynamics and partition. Walker-box ParA oscillation is restricted to the nucleoid region (Marston and Errington, 1999; Ebersbach and Gerdes, 2001), in contrast to MinD which oscillates over the full length of the cell (Raskin and de Boer, 1999); the difference presumably reflects the distinct affinities of ParA for DNA and MinD for the membrane. The involvement of non-specific DNA is also suggested by the ability of DNA to enhance ParB stimulation of ATP hydrolysis by Walker-box ParAs regardless of the presence of centromere sites.

A role for such DNA as an active participant in the partition mechanism has not been proposed. We report

here *in vitro* experiments which show that in the presence of ATP, SopA polymerizes without ATP hydrolysis. Neither SopB nor DNA is necessary for polymerization but when present both strongly affect it. We propose that interaction of Sop proteins with the nucleoid ensures that SopA polymerization occurs appropriately in space and time, and that it is thus a normal prerequisite for partition.

Results

Adenine nucleotide binding and hydrolysis by SopA

The known activities of ParA proteins are regulated by adenine nucleotides, making it likely that interaction of SopA with DNA would be also. We therefore carried out a biochemical characterization of SopA-adenine nucleotide interactions, using a spin-column assay to measure nucleotide binding (directly proportional to SopA concentration; Fig. 1A) and thin-layer chromatography to measure ATP hydrolysis. The half-life of SopA- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ complexes to which excess unlabelled ATP had been added was 14 min (Fig. 1B). Dissociation during the ~40 s spin-column assay was thus slight, which, together with the insignificant extent of hydrolysis (see below), allowed the spin-column assay to be used to obtain the binding curve shown in Fig. 1C. The molar ratio of bound ATP to eluted SopA was 0.76, which we corrected for in calculating absolute amounts of bound nucleotide. From the binding curve and regression analysis of the Scatchard plot (inset), we obtained an apparent K_d of 74 μM ATP and 0.81 binding sites per SopA monomer. This binding affinity is of the same order as those determined for ATP binding by other proteins of the ParA family: P1 ParA 33 μM (Davey and Funnell, 1997), *Caulobacter crescentus* ParA 50–60 μM (Easter and Gober, 2002), TP228 ParF 100 μM (Barilla *et al.*, 2005).

We could not detect ADP binding to SopA by the direct method above. We therefore assayed the ability of ADP to compete with $^{32}\text{P}\text{-ATP}$ for SopA protein (Fig. 1D). The concentration of unlabelled ATP needed to halve the amount of labelled complex was 290 μM , close to equimolarity with $^{32}\text{P}\text{-ATP}$ as expected. ADP reduced the formation of labelled complex to half the maximum at a concentration of 570 μM , about twice that of competing ATP; AMP scarcely affected complex formation. These data indicate that whereas SopA binds both ATP and ADP with comparable (though different) affinities, the ADP complex is much less stable, and could not be measured in our assay. SopA-ADP complex is likely to exist only transiently in the cell. The high off-rate for ADP distinguishes SopA from ParA of *Caulobacter crescentus* whose complex with ADP is stable enough to need ParB as an exchange factor to remove the nucleotide (Easter and Gober, 2002).

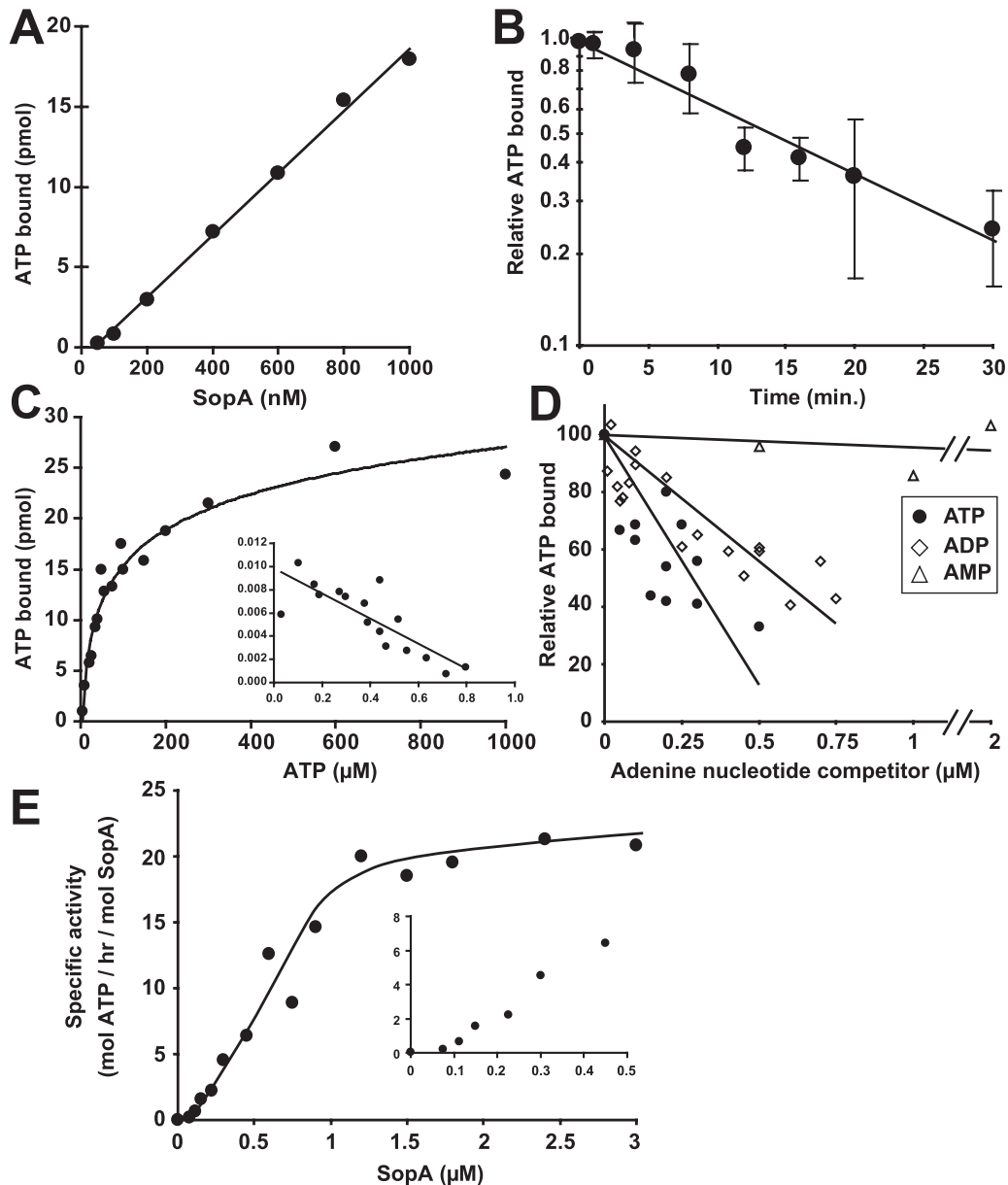


Fig. 1. Adenine nucleotide binding and hydrolysis.

A. ATP binding stoichiometry. [α - 32 P]-ATP (250 μ M) was incubated with increasing amounts of SopA, and the mixtures fractionated on a G-50 spin column (*Experimental procedures*). Excluded ATP was proportional to SopA concentration.

B. Half-life of SopA-ATP complexes. 40 pmol of SopA was incubated with 250 μ M of [α - 32 P]-ATP for 15 min before addition (time 0) of excess cold ATP, and samples removed at the indicated times for analysis as in (A). Bound ATP is normalized to the value at $t=0$. Points are averages of three independent determinations; error bars show standard deviations.

C. Titration of ATP. 40 pmol of SopA was incubated with increasing amounts of ATP and analysed as in (A). The inset shows the data plotted as a Scatchard curve (abscissa: pmol ATP/pmol SopA; ordinate: pmol ATP/pmol SopA/ μ M ATP) to determine biochemical constants. The two outliers in the Scatchard curve were not included in the calculation of these constants (regression coefficient $R^2 = 0.91$).

D. Competition analysis of adenine nucleotide affinity. 40 pmol of SopA was incubated with 250 μ M of [α - 32 P]-ATP in the presence of increasing amounts of non-radiolabelled ATP (filled circle), ADP (diamond) or AMP (triangle), incubated for 15 min at room temperature and analysed as in (A).

E. SopA ATPase exhibits cooperativity. SopA ATPase was measured in the presence of SopB and DNA at increasing concentrations of SopA protein (*Experimental procedures*). The inset shows the data for 0–0.5 μ M SopA on an expanded scale.

Hydrolysis of ATP at SopA concentrations up to 3 μ M was too low to be quantified accurately. Individually, SopB stimulated hydrolysis about fivefold and DNA about 1.4-fold, while together SopB and DNA increased hydrolysis by

a factor of at least 25. With these additions, specific activity rose sharply with increasing SopA concentration, reaching a maximum at about 1.2 μ M SopA (Fig. 1E). Such cooperativity is also exhibited by the actin type partition ATPase,

ParM, which forms polymers in an ATP-dependent manner (Moller-Jensen *et al.*, 2002). It appeared possible that cooperativity of SopA ATPase activity reflects a capacity of SopA protein to self-assemble into a large structure.

SopA self-assembly into large structures

We tested the propensity of SopA to self-associate by centrifuging samples that had been incubated with or without an adenine nucleotide and determining the amounts of SopA in the pellet and supernatant fractions by SDS-PAGE (Fig. 2A). Without nucleotide, SopA was recovered mainly in the supernatant. When ATP was present 70% of SopA was in the pellet, indicating self-assembly of SopA. Neither ADP nor the non-hydrolysable analogues ATP γ S and AMP-PNP increased sedimentation of SopA above the no-nucleotide background level. EDTA completely inhibited ATP-dependent sedimentation of SopA, consistent with the need for Mg²⁺ to stabilize adenine nucleotide interaction in this family of Walker-box ATPases (Hayashi *et al.*, 2001). These results are similar to those for ParF (Barilla *et al.*, 2005), except that polymerization did not occur when ATP was replaced by ATP γ S.

We used dynamic light scattering to follow the kinetics of self-assembly of SopA and to measure the hydrodynamic size of the particles formed. The results (Fig. 2B) confirmed the sedimentation analysis. In the absence of ATP, intensity of light scattering by SopA (4 μ M) remained constant at 10–12 Kcts s⁻¹ and particle size at 1–2 nm. Following addition of ATP, SopA intensity began to increase after 1–2 min, and rose over the following 4 min to an average value of 2000–2500 Kcts s⁻¹. Average particle size also increased, but instead of settling at a plateau it continued throughout the experiment, reaching a value of about 1 μ m by 30 min. Oscillation about the intensity plateau value might be due in part to partial disassembly and reassembly of SopA polymers, and the increase in particle size to incorporation of liberated SopA molecules into continuously growing polymers. The dependence of polymerization on SopA concentration is shown in Fig. 2C. At or below 1 μ M SopA no polymerization was seen, but polymerization occurs at 2 μ M and increases in speed and extent with concentration. These data imply that polymers only form if SopA is above a critical minimum concentration of between 1 and 2 μ M.

As seen in the sedimentation experiments, addition of ADP or ATP γ S did not result in observable polymerization (Fig. 2B). The failure of non-hydrolysable analogues to substitute for ATP in promoting self-assembly of SopA suggests a requirement for either ATP hydrolysis or a precise conformation of SopA in the ATP-bound form (Libante *et al.*, 2001). We detected no ATP hydrolysis at the concentration of SopA used over the duration of this assay (data not shown). Hence, self-assembly requires

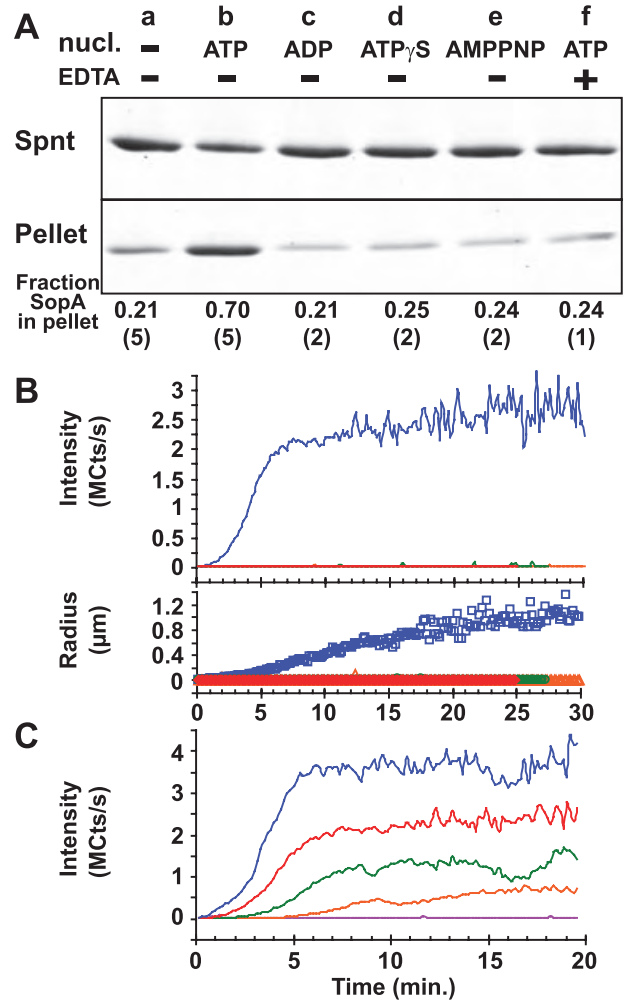


Fig. 2. Polymerization of SopA protein.

A. Sedimentation assay. Mixtures of 10 μ M SopA with 1 mM nucleotide (and 15 mM EDTA in lane f) were centrifuged, and supernatant (Spnt) and pellet fractions analysed by SDS-PAGE. The fractions of total SopA in the pellets, averaged over the number of determinations (in brackets), are shown below.

B. Dynamic light scattering assay. 4 μ M SopA was centrifuged for 5 min before addition, at time zero, of ATP (blue), ADP (green), ATP γ S (red) or water (orange). Top panel – intensity of scattered light; bottom panel – average polymer size (μ m).

C. SopA-concentration dependence of polymerization. SopA at 6 μ M (blue), 4 μ M (red), 3 μ M (green), 2 μ M (orange), 1 μ M (pink) was mixed with ATP at time zero and polymerization was followed by measuring scattered light.

SopA-ATP to adopt a precise conformation not attainable with the non-hydrolysable analogues used. Failure of these analogues to substitute for ATP in polymerization of MinD-ParA family proteins has been noted elsewhere (Hu *et al.*, 2002; Suefuji *et al.*, 2002; Ebersbach *et al.*, 2006).

Ultrastructure of SopA-ATP polymers

We used negative-stain electron microscopy to investigate the structure of SopA assemblies. In the absence of

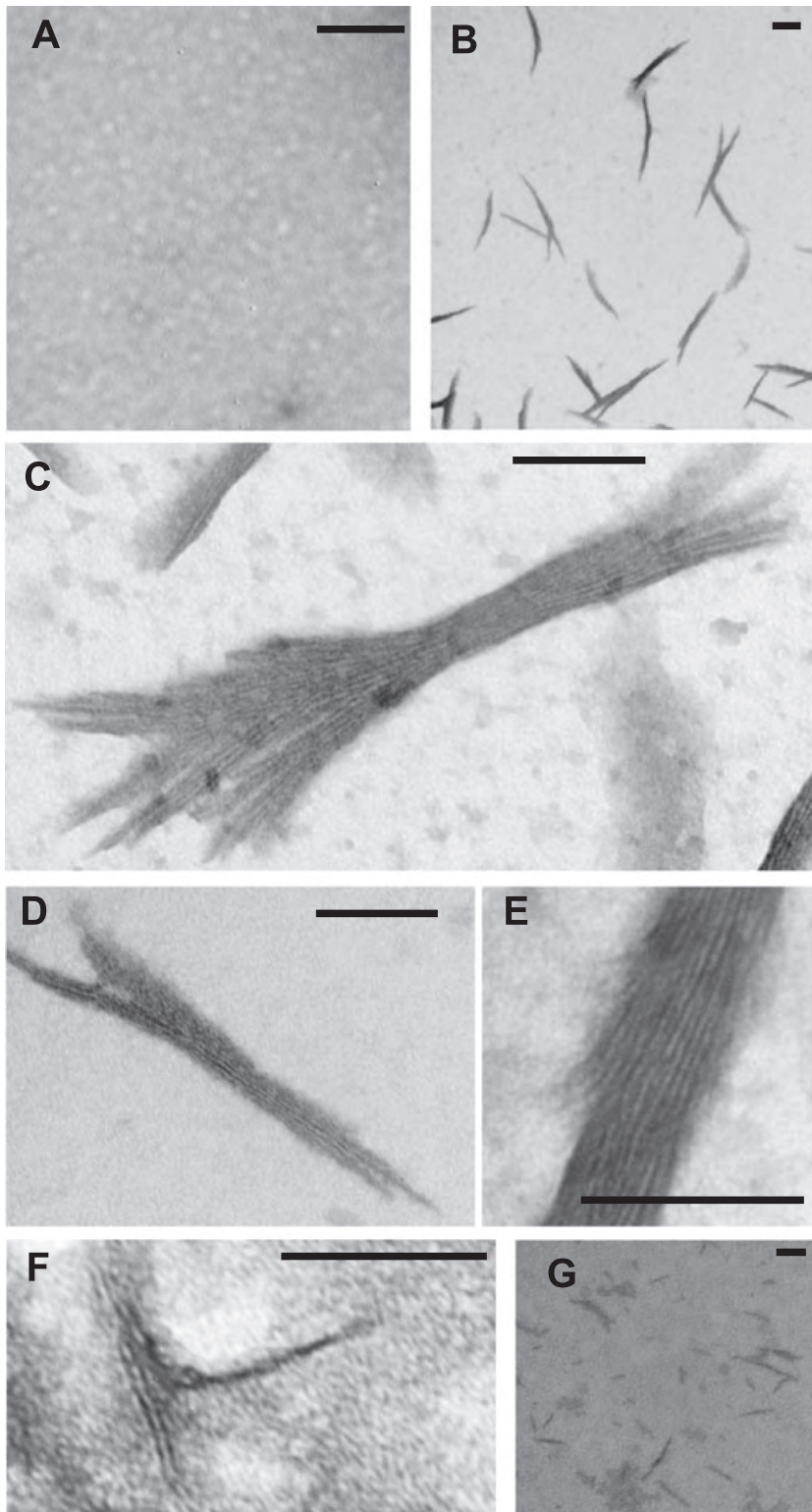


Fig. 3. SopA filament ultrastructure. A. Negatively stained globular structures formed by SopA without ATP. B. Fibres formed by SopA with ATP. C–E. SopA fibres at higher magnification. Residual negative stain overlaps filament bundles in C (top right) and D (top left). F. Two adjacent individual SopA filaments. G. Thin filaments formed by SopA with ATP γ S; this field is one of very few to show any fibre forms. Bars = 100 nm.

ATP or the presence of ADP, SopA appeared only as globular particles of 10–15 nm diameter (Fig. 3A). When SopA was incubated for 5 min with ATP, large, fibrous structures were visible (Fig. 3B). Fields with isolated

structures show bundles of filaments 200–500 nm long and 10–40 nm wide (Fig. 3C–E). Usually, one end of the SopA bundle appeared compact and the other frayed. This appearance is similar to that of assembled ParF

filaments (Barilla *et al.*, 2005), and could reflect orientation of filaments within the bundle. Prolonged incubation prior to applying reaction drops to electron microscopy grids did not change the appearance of the fibres (data not shown). At higher magnification (Fig. 3F), we saw individual filaments 3–4 nm wide. This is consistent with the appearance of about 10 filaments in bundles or rafts 40 nm across (Fig. 3C and E).

SopA also assembled as fibres in the presence of ATP γ S, but much less frequently. The fibres were shorter (< 100 nm long) than those made with ATP and did not form bundles (Fig. 3, compare B and G). As indicated by the centrifugation and light scattering assays, these results suggest that ATP hydrolysis is not required for SopA polymerization and that bound ATP induces an allosteric change allowing polymerization which ATP γ S cannot.

DNA inhibits SopA polymerization

ParA family proteins normally act on the partition complex through their cognate ParB proteins (Bouet and Funnell, 1999; Lemonnier *et al.*, 2000). We therefore tested the effect of SopB–*sopC* complexes on polymerization. Unexpectedly, we found that *sopC* DNA alone inhibited SopA polymerization. Sedimentation of SopA–ATP was reduced to near background levels by 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ DNA of the *sopC*-plasmid, pJYB56 (compare Fig. 4A, lane a with Fig. 2A, lane b). Finding that the same result was obtained with non-*sopC* DNA, either linear or supercoiled (data not shown), we then measured sedimentation of SopA as a function of the concentration of non-specific DNA (pBSKS⁺). The results (Fig. 4B) show that SopA polymerization was not affected at DNA concentrations below 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, but declined sharply between 5 and 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ DNA and was totally inhibited above 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$, corresponding to a molar ratio of 4–5 bp per SopA monomer. No increase in ATP hydrolysis occurred under these conditions (our unpublished data).

Dynamic light scattering showed that at concentrations of a 33-mer duplex DNA fragment (SG1-2) $\geq 0.25 \mu\text{M}$ (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) the rapidity and extent of polymerization progressively declined (Fig. 4C). No inhibition was observed when single-stranded DNA (SG1) was added at a concentration (4 μM) at which double-stranded DNA abolished polymerization. Light scattering intensity was half maximal at 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ DNA, the same concentration that gave half maximal pelleting in the sedimentation assay (Fig. 4B), indicating that both assays measure the same self-assembly property of SopA. The narrow concentration range of the transition suggests that SopA polymers become stable enough to be detected only after achieving a threshold size.

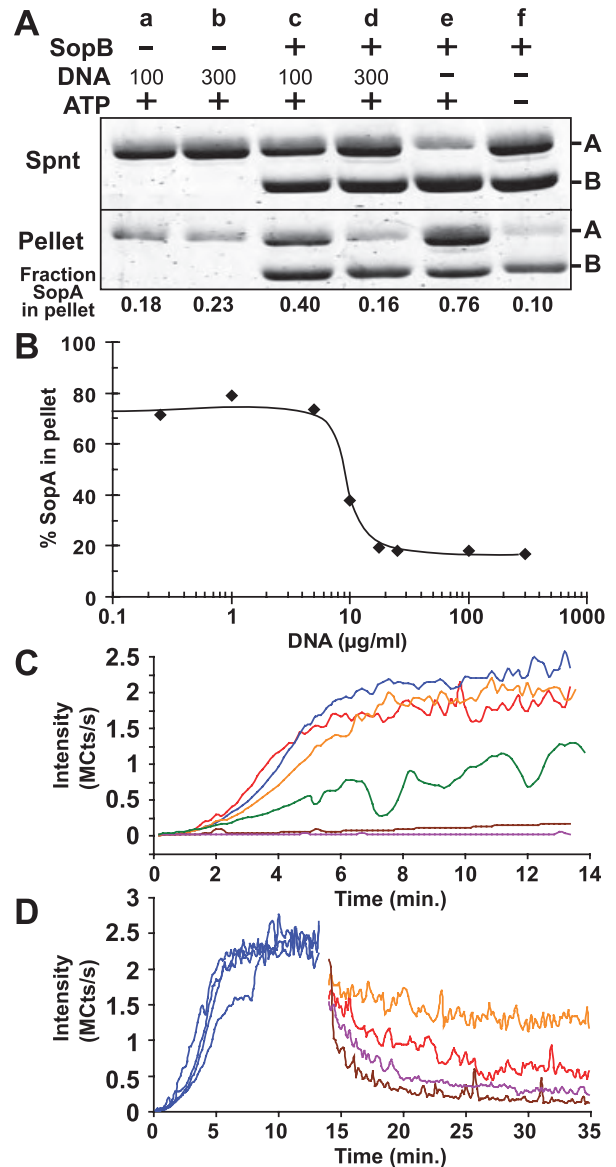


Fig. 4. Inhibition of SopA polymerization by DNA. **A.** SopA (8 μM) in the presence (+) or absence (-) of SopB (5.6 μM), DNA [pJYB56 (*sopC*) at the concentrations ($\mu\text{g ml}^{-1}$) shown] and ATP (1 mM) was sedimented and assayed as in the experiment of Fig. 2A, except that centrifugation was at 21 000 g instead of 100 000 g. At the right, A and B indicate SopA and SopB. Fractions of SopA pelleted are averages of two to five determinations. 15–20% of the SopB was recovered in the pellet independently of SopA and ATP. **B.** Sedimentation of SopA in the presence of increasing concentrations of non-specific (pBSKS⁺) DNA was assayed as in the experiment of (A). **C.** Intensity of light scattered by SopA (4 μM) was determined in the absence of DNA (blue), and in the presence of duplex DNA (SG1-2) at 0.25 μM (red), 0.5 μM (green), 1 μM (brown), 2 μM (pink) or single-stranded DNA (4 μM SG1; orange). Reactions were initiated by addition of ATP at time zero. **D.** Thirteen minutes after initiating polymerization of SopA (4 μM) by addition of ATP (blue lines), SG1-2 duplex DNA was added at 1 μM (orange), 4 μM (red), 6 μM (pink) and 8 μM (brown). The reactions were carried out sequentially and monitored by dynamic light scattering.

To determine whether DNA affects pre-formed SopA filaments, we added the 33-mer, SG1-2, at various concentrations after the plateau level of polymers had been reached (Fig. 4D). Intensity of light scattering dropped immediately, to an extent proportional to DNA concentration, before settling at a new level. The initial concentration-independent fall in intensity is consistent with rapid depolymerization of the filaments. ATP hydrolysis under these conditions is too slow to account by itself for the very rapid disassembly of SopA seen. The new plateau levels could reflect the inability of liberated SopA to rejoin the remaining filaments, for the same reason that DNA inhibits *de novo* polymerization of SopA.

SopB promotes SopA polymerization

SopB stimulates all the known activities of SopA and so would be expected to influence its polymerization. In the presence of ATP, an equimolar mixture of SopA and SopB caused no change in the sedimentation of either protein (compare Fig. 4, lane e with Fig. 2, lane b, and Fig. S1). However, when SopB is added together with *sopC* DNA, i.e. as the partition complex, before addition of SopA and ATP, it relieves the inhibition of sedimentation (Fig. 4, compare lanes a and c). When DNA concentration was raised threefold, relief by SopB was not seen. Inhibition by non-specific DNA (pBSKS⁺) was also suppressed by SopB (data not shown). These results suggest that the ratio of SopB to DNA determines the extent of SopA polymerization. We examined this relationship by adding increasing amounts of SopB protein to a polymerization mixture in the presence of the minimum concentration of non-specific DNA (25 µg ml⁻¹) necessary for full inhibition (Fig. 5A). Added SopB progressively reversed DNA inhibition until at 5.6 µM SopB essentially all the SopA was recovered in the pellet. As an index of the efficiency of SopB suppression, the ratio of SopB to DNA at 50% suppression was calculated to be one SopB dimer to 65 bp (Fig. 5B). Over the 30 min period of the assay, stimulation of ATPase by SopB consumed about 5% of the ATP available to SopA.

SopB protein could restore polymerization either by masking the DNA or through an interaction with SopA protein which renders it immune to DNA-mediated inhibition. To distinguish between these possibilities we assayed polymerization in the presence of an unrelated DNA-binding peptide, DT1, which consists of the N-terminal 29 amino acids of the histone H3 tail (Zheng and Hayes, 2003). Using a filter-retention assay, we confirmed that DT1 binds to DNA in our conditions (data not shown). Figure 5C shows the results of assaying DNA-mediated inhibition of SopA polymerization as a function of the concentration of added DT1, as for SopB (Fig. 5A). DT1 had no effect below 3 µM, but SopA polymerization

rose progressively as DT1 concentration increased, to reach a maximum at 15 µM. DNA-mediated inhibition was suppressed to 50% at a ratio of one DT1 molecule to 4 bp.

This result indicates that masking of DNA by SopB or other DNA-binding proteins can restore SopA polymerization. To examine more closely whether the effect of SopB is restricted to masking of DNA, we followed the kinetics of polymerization by dynamic light scattering. Figure 5E reveals that, in the presence of SopB at equimolar concentration, SopA assembly is faster and rises to a two- to threefold higher level, showing that SopB also promotes SopA polymerization directly without affecting the lag time; this polymerization remained strictly ATP-dependent (data not shown). Nevertheless, the inability of 1 µM SopA to polymerize was not overcome even with a twofold molar excess of SopB.

SopA and SopB proteins bind non-specifically to DNA

Inhibition of SopA polymerization by non-sequence-specific DNA could be interpreted as competition between DNA and SopA-ATP for the SopA polymerization interface. If this is the case, DNA would be expected to bind more readily to SopA-ATP than to other forms because only the ATP form of SopA polymerizes (Fig. 2). We first examined the non-specific DNA binding capacity of SopA by gel mobility shift analysis. High concentrations (4 µM) of SopA-ATP gave limited, diffuse retardation of a linear DNA fragment; SopA-ADP and SopA alone gave none (data not shown). Filter retention proved to be a more sensitive assay method; DNA retained was proportional to SopA concentration (Fig. 6A). DNA retention was about the same in the absence of nucleotide as in the presence of ADP; 10–12% was retained at 4 µM SopA. In the presence of ATP, DNA retention was significantly higher, 40% at 4 µM SopA. Thus the ATP form of SopA protein has a greater affinity for non-specific DNA than the ADP or nucleotide-free forms. This specificity corresponds to that of SopA polymerization itself, consistent with the idea of reciprocal inhibition of DNA binding and self-association.

If the restoration of SopA polymerization by SopB protein reflects the ability of SopB to compete for non-specific DNA, its affinity for such DNA should be comparable to that of SopA. SopB bound non-specific DNA about twice as efficiently as SopA-ATP at low protein concentrations, as measured by filter retention (Fig. 6A). Coupled with high local concentrations of SopB in cells carrying *sopC* plasmids (Hirano *et al.*, 1998), this binding capacity suggests that SopB counteracting DNA-mediated inhibition of polymerization *in vivo* is a plausible scenario.

*Disruption of SopA binding to the *sop* promoter by ATP*

Binding of SopA-ATP to non-specific DNA may well affect specific binding of SopA to the four operator sites in its

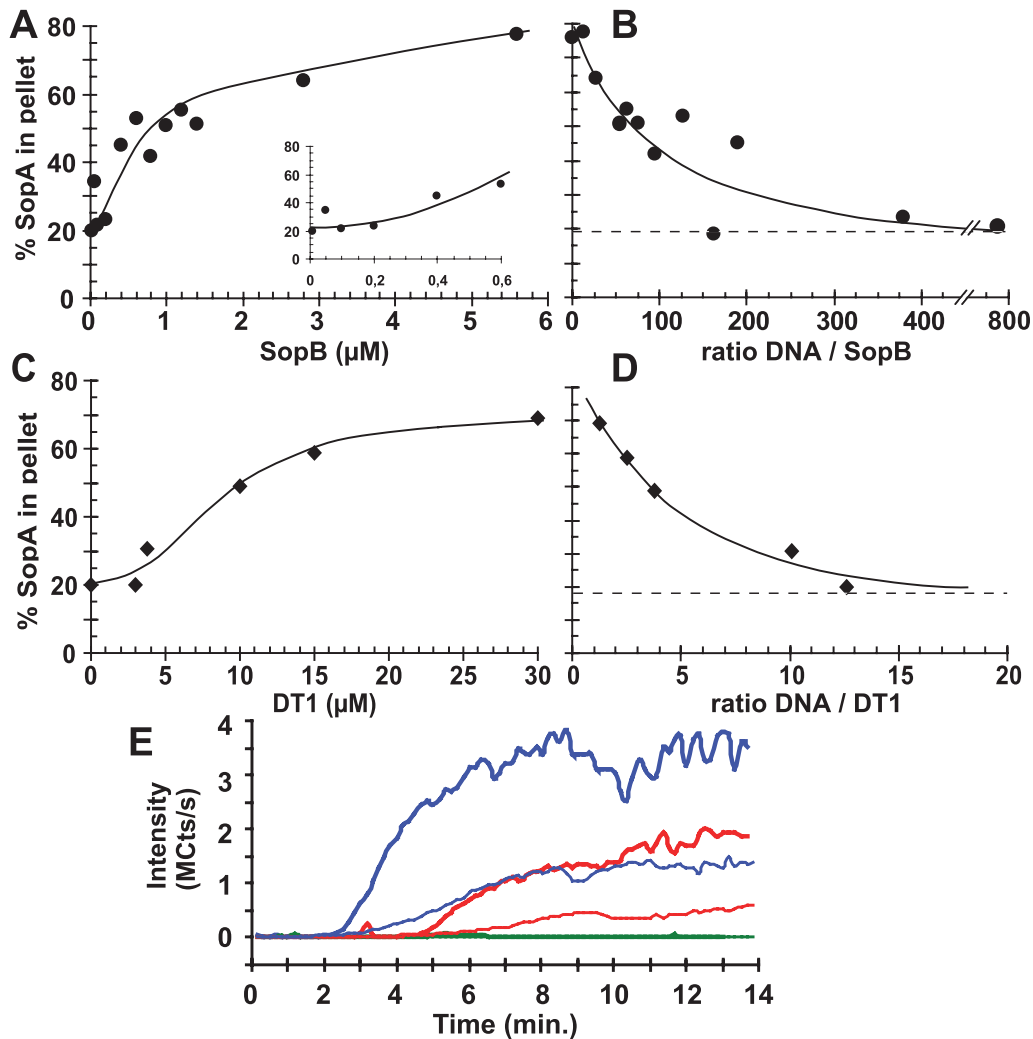


Fig. 5. Effect of SopB on SopA polymerization.

A. Polymerization of SopA (8 μM) in the presence of 25 μg ml⁻¹ non-specific (pBSKS⁺) DNA was measured as a function of SopB concentration, using the sedimentation assay. The inset shows the data for 0–0.6 μM SopB on an expanded scale.

B. The fraction of SopA pelleted is plotted against the ratio of bp DNA to molecules of SopB. Dotted lines show the average fraction of SopA pelleted in the absence of ATP.

C and D. Data equivalent to those in A, B for the peptide DT1.

E. Activation of SopA polymerization by SopB. SopA and SopB were mixed in PA buffer and centrifuged prior to addition of ATP at time zero. SopA polymerization was followed by dynamic light scattering. Blue, 3 μM SopA, 3 μM SopB; red, 2 μM SopA, 2 μM SopB; green, 1 μM SopA, 2 μM SopB. The thin lines are the data of Fig. 2 showing polymerization of SopA at the same concentrations in the absence of SopB.

promoter region, *psop* (Mori *et al.*, 1989; Biek and Strings, 1995). Both ADP and ATP forms of P1 ParA bind to the *parA* promoter region (Davey and Funnell, 1997) but only the former complex was detected by electrophoretic mobility shift analysis (Bouet and Funnell, 1999). We used the same technique to examine specific binding of SopA to *psop*, with salmon sperm DNA in the mixture as a non-specific binding discriminator. In the absence of added nucleotide, SopA retarded migration of a radioactively labelled *psop* fragment without affecting the internal control fragment, *repE* (Fig. 6B, lanes 2–4). With ADP, retardation was moderately enhanced (compare lanes 2

and 5). The retardation in both cases is slight and proportional to SopA concentration rather than uniquely defined. We attribute this to a SopA-*psop* complex which is inherently unstable *in vitro* and only detectable because the caged environment of the gel matrix favours reassembly (Cann, 1989).

In the presence of ATP, *psop* retardation was barely detectable (Fig. 6B, lanes 8–10), implying that ATP impedes SopA binding to the promoter. Polymerization to a form inappropriate for operator binding is not likely to be responsible for absence of the complex because the concentration of non-specific DNA, 100 μg ml⁻¹, is far above

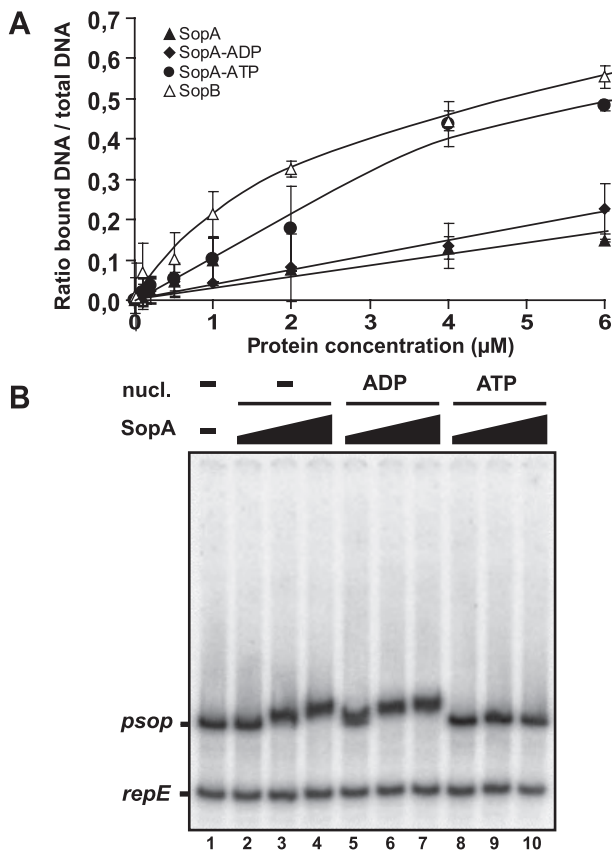


Fig. 6. DNA binding properties of SopA. **A.** Non-specific DNA binding of SopA and SopB. Radiolabelled *repE* fragment DNA was incubated with nucleotides (1 mM) and increasing concentrations of SopA (filled symbols) or SopB (open symbols) as shown, and the amounts retained by filtration measured. The data are from three independent experiments. **B.** Gel-retardation assay of SopA-*sop* operator binding. Combined 32 P-labelled *psop* and *repE* fragments were incubated with SopA protein at various concentrations (50 nM, lanes 2, 5, 8; 250 nM, lanes 3, 6, 9; 750 nM, lanes 4, 7, 10) in the presence or absence of nucleotides (1 mM) as shown, and the mixtures were subjected to electrophoresis in TGM buffer. The positions of the probe fragments are indicated on the left.

that at which polymers can form (Fig. 4B). Loss of intrinsic affinity following binding of ATP is not excluded as an explanation, but the results in this paper imply that the non-specific DNA competes for SopA-ATP in the binding mixture, thus leaving too little to bind and retard *psop*. Suitability for repressor function of adenine nucleotide-bound forms of SopA could thus parallel that of P1 ParA: ADP reinforces SopA binding to the promoter while ATP inhibits it, probably by enabling SopA to bind to alternative, non-specific binding sites.

Discussion

A consistent feature of Walker-box ParA proteins is the dual role that non-specific DNA plays in their activity. DNA

constitutes the nucleoid field over which these proteins move and position their replicons, and in the presence of cognate ParB proteins enhances ParA-catalysed hydrolysis of ATP. Both are presumed to be important for the partition mechanism. But just how the DNA acts at the molecular level had not been investigated.

Our *in vitro* experiments demonstrate two properties of native SopA protein in its ATP-bound form: an intrinsic capacity to polymerize, and non-sequence-specific binding to DNA. Notably, the results show that the latter antagonizes the former – DNA above a critical concentration inhibits polymerization of SopA-ATP, without significantly increasing ATP hydrolysis. SopB protein reverses this inhibition of SopA polymerization, probably by coating the DNA to reduce its access to SopA. If the self-assembly reflects activity of SopA protein in partition, as is generally supposed for other ParA family members, then attempts to understand the partition mechanism must now take these non-specific DNA-binding properties into account. We have not formally excluded affinity for histone-like proteins or repulsion by components of the non-nucleoid cytosol as explanations for nucleoid localization of SopA, but our results point to affinity for nucleoid DNA as the more likely basis for it.

Although it is too early to tell how DNA affects other ParA members, the polymerization that it regulates in the case of SopA appears to be a general property of these proteins. ATP activates conversion of SopA to higher-order structures that appear remarkably similar to the bundles or rafts formed by MinD and ParF (Suefuji *et al.*, 2002; Barilla *et al.*, 2005). The basic filaments have about the same width (3–4 nm) and the multiple parallel filaments that make up the bundles are of about the same length (200–500 nm) with one end more frayed than the other, suggesting polarity. We saw no sign of the very long (4–16 µm) SopA fibres or of the astral shapes reported by Lim *et al.* (2005). Differences in sample preparation or visualization conditions might account for the discrepancy. Alternatively, the histidine tag on the SopA used by Lim *et al.* (2005) may have altered the protein's polymerization properties, as suggested by Suefuji *et al.* (2002) to explain why they observed his₆-MinD to form bundled filaments while Hu *et al.* (2002) saw native MinD to form tubes. SopA and other ParA family proteins may have several self-assembly options, as noted for another non-specific DNA-binding Walker-box ATPase, MuB (Greene and Mizuuchi, 2002). It is also possible that none of these structures correspond closely to those formed in more dynamic conditions *in vivo*. However, the consistent *in vitro* response of polymerization to nucleotides – stimulation by ATP and by the absence of hydrolysis, and inhibition by ADP – is probably relevant *in vivo*, where it would represent an adenine nucleotide control point.

Despite the common response to nucleotides and the similarity of SopA to ParF and MinD at the ultrastructural level, polymerization of SopA differs in certain respects from that of other ParA family proteins studied. One is the autonomy of polymerization. Polymerization of Soj (of *Thermus thermophilus*) and MinD depends on the presence of their respective activating surfaces, DNA and membrane (Hu *et al.*, 2002; Leonard *et al.*, 2005), whereas SopA polymerizes alone. Indeed the Soj polymer observed by Leonard *et al.* (2005) was a regular nucleoprotein filament. In addition, MinD polymers are disassembled *in vitro* by the protein that stimulates its ATPase, MinE (Hu *et al.*, 2002; Suefuji *et al.*, 2002), whereas SopA polymerization is moderately stimulated by SopB protein (Fig. 5E). In this, SopA resembles ParF whose polymerization is stimulated by its SopB analogue, ParG (Barilla *et al.*, 2005), although SopB protein does not remain associated (co-sediment) with SopA polymers as ParG does with those of ParF. Thus, while Walker-box ParA members share the ability to polymerize, the only unifying element of the reactions studied so far is a need for ATP.

How do the properties of the Sop proteins revealed here bear on their roles in partition? The range of concentration of SopA-ATP, 2–10 μM , at which we observed polymerization *in vitro* (Fig. 3, and data not shown) is similar to that in cells carrying wild-type mini-F, 3–5 μM (Bouet *et al.*, 2005; Adachi *et al.*, 2006). It is thus likely that left to itself *in vivo*, SopA-ATP would polymerize, with potentially catastrophic consequences. Haphazard polymerization, often far from partition complexes able to trigger dynamic relocation and partition, could sequester enough SopA protein to deplete the pool to subfunctional levels. The dispersion of SopA protein over the nucleoid (Hirano *et al.*, 1998) shows that this does not generally happen. We propose that the role of nucleoid DNA in F plasmid partition is to prevent inappropriate polymerization of SopA protein, as illustrated in Fig. 7; its concentration *in vivo*, $\sim 30 \text{ mg ml}^{-1}$, is well beyond (nominally 1000-fold) the inhibitory concentration *in vitro*. Not enough is known to predict whether it would do this by directly competing for the SopA–SopA interface or by inducing deformation of the interface through a more distant interaction. The ATP form of ParF protein also polymerizes autonomously *in vitro* (Barilla *et al.*, 2005) and so would face the same potential problem *in vivo* as SopA; its non-specific DNA binding properties have not yet been reported.

Assuming that the capacity of SopA to polymerize underlies its dynamic behaviour and that the latter is an essential element of the partition mechanism, the inhibition exerted by nucleoid DNA must be suppressed to allow partition to take place. SopB protein could serve this function. SopB bound at *sopC* is known to recruit

further SopB molecules to extend its complex along neighbouring DNA (Biek and Strings, 1995; Lynch and Wang, 1995). Our finding that SopB protein can bind to DNA without this priming suggests that by raising the local concentration of SopB the partition complex can promote coverage of nearby nucleoid DNA (*in trans* spreading) as well. Moreover, ParB family proteins, including SopB, are invariably seen to be concentrated within one or a few foci in cells carrying their centromere binding sites (Bignell *et al.*, 1999; Erdmann *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2005; Adachi *et al.*, 2006). We suggest that *in vivo*, the high local concentration of SopB reduces the accessibility of DNA, to create a 'DNA-depleted' zone within which SopA protein can initiate polymerization. SopB might also contribute directly: natural affinity for the SopB focus could concentrate SopA beyond the threshold needed for polymerization (Fig. 2C), and direct stimulation by SopB (Fig. 5E) could 'kick start' the process.

Incorporation of nucleoid DNA in the postulated 'DNA-depleted' zone could account for the apparently limited contribution of P1 ParB spreading to partition of *parS*-carrying plasmids reported by Rodionov and Yarmolinsky (2004). *In cis* spreading was prevented by insertion of roadblocks on either side of *parS*, but stability was reduced only slightly. This result is understandable if *in trans* spreading onto adjacent nucleoid DNA contributes substantially to initiating partition.

What enables the non-sequence-specific DNA binding by SopA on which the model shown in Fig. 7 is based? In principle the predicted N-terminal helix–turn–helix motif by which SopA fastens to and represses its promoter could be used for binding non-specifically to other DNA. However, ParA proteins lacking the N-terminal specific binding motif exhibit affinity for the nucleoid (Ebersbach and Gerdes, 2004) and the Soj protein of *Thermus thermophilus* binds to non-specific DNA (Leonard *et al.*, 2005). These observations suggest that SopA interacts non-specifically with DNA via a second domain which is activated by binding of ATP. Where this domain maps on SopA, or on Soj, is not yet known. Whether basal-level binding by nucleotide-free and ADP forms of SopA (Fig. 6) involves the same domain or reflects non-specific ionic interactions also remains to be determined.

The consequences of non-specific DNA binding described here might be more relevant to the early, regulatory phase of partition than to the act of plasmid displacement itself. In particular, ATP hydrolytic activity of SopA, which is in any case very weak, did not significantly affect the interactions we observed. *In vivo*, however, SopB together with DNA at high concentration may well stimulate ATP hydrolysis and so potentiate depolymerization (Hunding *et al.*, 2003). By alternately

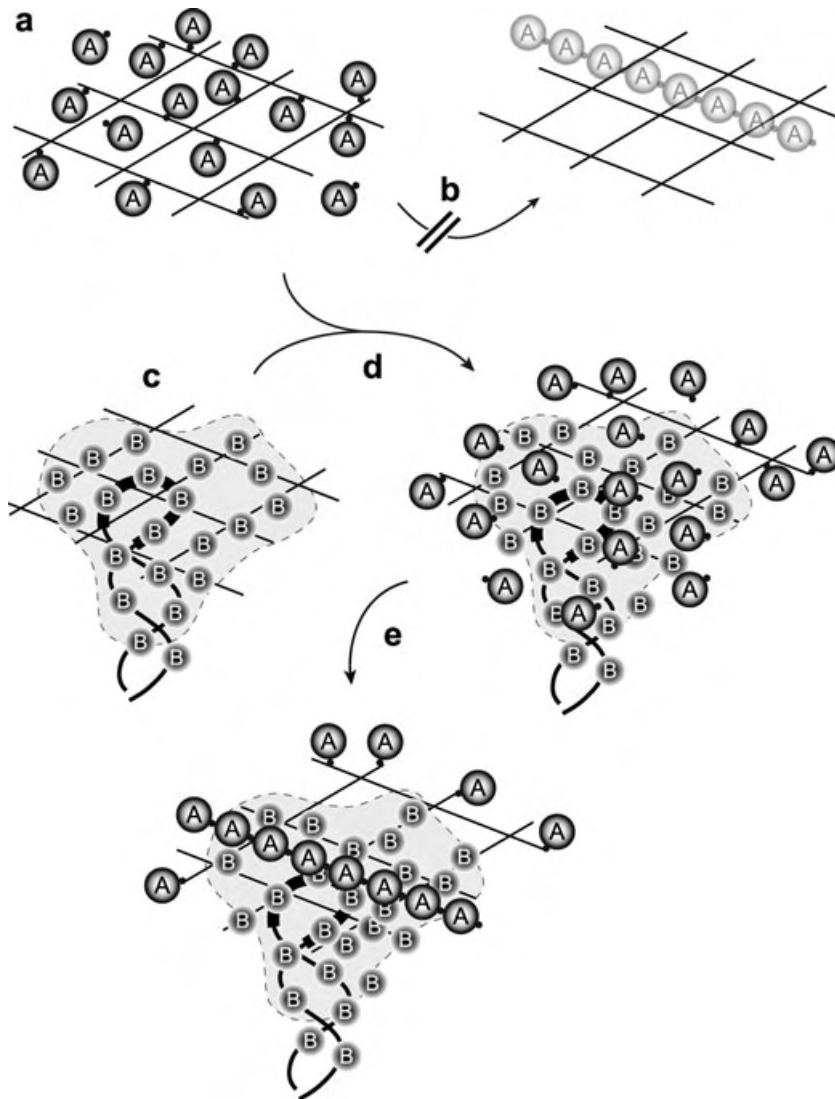


Fig. 7. Model for initiation of SopA polymerization *in vivo*. (a) SopA-ATP (sphere A) binds reversibly via a DNA interaction domain (nipple) to the nucleoid (crossed lines). (b) Nucleoid DNA binding prevents polymerization. (c) When F plasmid (curves) is present, SopB (sphere B) binds to *sopC* (thickened curve) and this complex nucleates extension of SopB which smothers enough neighbouring F and nucleoid DNA to create a 'DNA-depleted' zone (shaded). (d) Free SopA-ATP encounters the zone (and is possibly retained by affinity for SopB), where it is shielded from DNA. (e) SopA-ATP in the 'DNA-depleted' zone is free to initiate self-assembly of SopA and propagation of the polymer form.

shielding SopA from DNA and activating its ATPase, SopB could drive the wave-like dynamics of SopA and partition of its plasmid.

Experimental procedures

Proteins and DNA

Native SopA and SopB proteins were purified as described in *Supplementary material*. Synthesized DT1 peptide, corresponding to the N-terminal 29 amino acids of human histone H3, was provided by D. Trouche. Radioactively labelled DNA fragments for the gel mobility shift assay were prepared by PCR amplification from pDAG114 in the presence of [α - 32 P]-dATP, using oligonucleotides PsopA1 and PsopA2 for *psop* (168 bp) or RepE1 and RepE2 for *repE* (127 bp). Non-specific DNAs used in the polymerization assay were sonicated calf thymus DNA, supercoiled or linearized pBSKS(+) and pJYB56, a pBSKS(+) derivative carrying two tandem SopB binding sites. SG1-2 DNA duplex DNA was obtained

from hybridization of SG1, 5'-GTACAAGTCTGGTTCTGGTTCTGGTTCTGGTCC, and its complement, SG2.

Gel mobility shift assay

The standard reaction mixture (10 μ l) contained 1 nM 32 P-labelled DNA in 50 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10% glycerol, 100 μ g ml⁻¹ BSA, 100 μ g ml⁻¹ sonicated salmon sperm DNA and 1 mM DTT. To this were added protein at various concentrations and 1 mM adenine nucleotide as appropriate. The mixtures were assembled on ice, incubated for 10 min at 30°C, and analysed by electrophoresis in 6% polyacrylamide gels in TBM (90 mM Tris borate, 10 mM MgCl₂) or TGM (25 mM Tris base, 190 mM glycine, 10 mM MgCl₂). In some experiments, adenine nucleotides (0.1 mM) were included in the gel and in the top (cathode) buffer. Electrophoresis was at 160 V for 5–6 h at 4°C. Gels were fixed with 10% acetic acid–10% methanol, dried onto Whatman paper, and exposed to a phosphor screen for imaging (Fuji FLA 3000 phosphorimager). Images were analysed with Image Gauge software (Fuji).

Adenine nucleotide binding assay

Binding was determined as the amount of ATP that co-eluted with SopA from a centrifuged gel filtration (G-50 resin, Pharmacia) column (Klemm *et al.*, 1997). The column (1 ml) was equilibrated with buffer A (50 mM HEPES-KOH (pH 7.8), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 100 µg ml⁻¹ BSA). Mixtures (50 µl) containing [α -³²P]-ATP, SopA and, where indicated, buffered adenine nucleotide competitor were incubated at room temperature for 20 min, then loaded onto the column and centrifuged at 2000 g for 2 min. Radioactivity in the eluate was measured by Cerenkov counting.

ATPase assay

SopA ATPase activity was measured as the rate of ADP formation during incubation in 10 µl buffer A containing 1 mM [α -³²P]-ATP. Where indicated, DNA (100 µg ml⁻¹) and SopB (2 µM), both verified to be free of contaminating ATPase activity, were added. Reaction mixtures were incubated at 37°C for 4 h and quenched by addition of 5 µl of 3 mM ATP, 3 mM ADP and 50 mM EDTA. 2.5 µl of each sample was applied to a TLC plate and the chromatograph developed with 1 M formic acid/LiCl. The plates were dried, exposed to a phosphor screen and analysed as above.

Sedimentation assay

SopA protein solutions were centrifuged at 100 000 g for 15 min at 20°C to remove any prior aggregates. The supernatants were then incubated at 8–10 µM (see legends of Figures) in PA buffer (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT), with or without buffered adenine nucleotides as indicated, in a total volume of 20 µl for 5 min at room temperature. The mixtures were centrifuged at 100 000 g for 15 min at 20°C. Centrifugation at 21 000 g for 30 min gave the same result. Supernatants (19 µl) were carefully recovered and mixed with 31 µl of 1.5× SDS sample buffer. The remaining 1 µl and the pellet were resuspended in 50 µl of 1× SDS sample buffer. Samples (15 µl) were subjected to SDS-PAGE, stained with Sypro Orange and quantified by FluorImaging (FluorImager 585 – Molecular Dynamics) and ImageQuant software (Molecular dynamics).

Dynamic light scattering

SopA was mixed with PA buffer (see *Sedimentation assay*) and, when appropriate, DNA or SopB, and centrifuged at 20°C for 5 min. ATP was added at 1 mM final concentration to supernatant (final volume 18 µl) to start the reaction, transferred immediately to a Dynapro System photometer in a 15 µl quartz cuvette and exposed to laser light at 824 nm. Light scattered at 90° was measured every 10 s as photons per second and analysed using Dynamics V6 software. The intensity is proportional to the size and concentration of the scattering particles. Data shown in *Results* were from experiments carried out at 20°C; the same intensities, particle sizes and relative kinetics were seen in experiments done at 30°C.

Electron microscopy

Pre-centrifuged SopA (21 000 g, 30 min, 4°C) was mixed with buffer PA (see *Sedimentation assay*) at room temperature.

Standard reactions were started by addition of 1 mM buffered ATP and incubated at room temperature for 5 min, before being applied to carbon-coated copper grids (100 or 400 mesh) that had been glow discharged. After 30–60 s, the drops were blotted and the grids were stained with uranyl acetate (1%) for 1 min, blotted and washed once in H₂O for 30 s. Grids were examined with a transmission electron microscope (Jeol 1200 EX). Images were acquired using a digital camera (AMT-USA) at 40–300 000× magnification.

Filter binding assay

Non-specific DNA binding activity was assayed by the double-filter method, essentially as described (Wong and Lohman, 1993), except that the DEAE membrane was replaced by a positively charged membrane (Biodyne B – Pall Corporation). Reaction mixtures (20 µl for SopA and SopB, 30 µl for DT1) were assembled in PA buffer (see above) containing 1 nM of radiolabelled repE DNA, incubated for 15 min at room temperature, chilled on ice, loaded onto pre-cooled membranes equilibrated with PA buffer, and washed with 100 µl (SopA, SopB) or 120 µl (DT1) of PA buffer. Filters were dried, exposed to a phosphor screen and analysed as above.

Acknowledgments

M. Grigoriev and D. Trouche kindly provided DT1 peptide. We thank J. Rech for technical assistance, D. Villa for imaging, P. Rousseau for advice on FPLC, V. Guillet for DLS, F. Cornet and M. Chandler for helpful comments on the manuscript, and members of the group Dynamique des Replicons Bactériens for discussions. This work was supported by the soutien de base du CNRS and a Bourse régionale (La Réunion) de MR2 to Y.A.-S.

References

- Adachi, S., Hori, K., and Hiraga, S. (2006) Subcellular positioning of F plasmid mediated by dynamic localization of SopA and SopB. *J Mol Biol* **356**: 850–863.
- Barilla, D., Rosenberg, M.F., Nobbmann, U., and Hayes, F. (2005) Bacterial DNA segregation dynamics mediated by the polymerizing protein ParF. *EMBO J* **24**: 1453–1464.
- Biek, D.P., and Strings, J. (1995) Partition functions of mini-F affect plasmid DNA topology in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **246**: 388–400.
- Bignell, C.R., Haines, A.S., Khare, D., and Thomas, C.M. (1999) Effect of growth rate and *incC* mutation on symmetric plasmid distribution by the IncP-1 partitioning apparatus. *Mol Microbiol* **34**: 205–216.
- Bork, P., Sander, C., and Valencia, A. (1992) An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7290–7294.
- Bouet, J.Y., and Funnell, B.E. (1999) P1 ParA interacts with the P1 partition complex at *parS* and an ATP-ADP switch controls ParA activities. *EMBO J* **18**: 1415–1424.
- Bouet, J.Y., Rech, J., Egloff, S., Biek, D.P., and Lane, D. (2005) Probing plasmid partition with centromere-based incompatibility. *Mol Microbiol* **55**: 511–525.

- Cann, J.R. (1989) Phenomenological theory of gel electrophoresis of protein-nucleic acid complexes. *J Biol Chem* **264**: 17032–17040.
- Davey, M.J., and Funnell, B.E. (1994) The P1 plasmid partition protein ParA. A role for ATP in site-specific DNA binding. *J Biol Chem* **269**: 29908–29913.
- Davey, M.J., and Funnell, B.E. (1997) Modulation of the P1 plasmid partition protein ParA by ATP, ADP, and P1 ParB. *J Biol Chem* **272**: 15286–15292.
- Davis, M.A., Martin, K.A., and Austin, S.J. (1992) Biochemical activities of the ParA partition protein of the P1 plasmid. *Mol Microbiol* **6**: 1141–1147.
- Davis, M.A., Radnedge, L., Martin, K.A., Hayes, F., Youngren, B., and Austin, S.J. (1996) The P1 ParA protein and its ATPase activity play a direct role in the segregation of plasmid copies to daughter cells. *Mol Microbiol* **21**: 1029–1036.
- Easter, J., Jr, and Gober, J.W. (2002) ParB-stimulated nucleotide exchange regulates a switch in functionally distinct ParA activities. *Mol Cell* **10**: 427–434.
- Ebersbach, G., and Gerdes, K. (2001) The double par locus of virulence factor pB171: DNA segregation is correlated with oscillation of ParA. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 15078–15083.
- Ebersbach, G., and Gerdes, K. (2004) Bacterial mitosis: partitioning protein ParA oscillates in spiral-shaped structures and positions plasmids at mid-cell. *Mol Microbiol* **52**: 385–398.
- Ebersbach, G., and Gerdes, K. (2005) Plasmid segregation mechanisms. *Annu Rev Genet* **39**: 453–479.
- Ebersbach, G., Ringgaard, S., Moller-Jensen, J., Wang, Q., Sherratt, D.J., and Gerdes, K. (2006) Regular cellular distribution of plasmids by oscillating and filament-forming ParA ATPase of plasmid pB171. *Mol Microbiol* **61**: 1428–1442.
- Edgar, R., Chatteraj, D.K., and Yarmolinsky, M. (2001) Pairing of P1 plasmid partition sites by ParB. *Mol Microbiol* **42**: 1363–1370.
- Edgar, R., Biek, D., and Yarmolinsky, M. (2006) P1 plasmid partition: in vivo evidence for the ParA- and ParB-mediated formation of an anchored parS complex in the absence of a partner parS. *Mol Microbiol* **59**: 276–287.
- Erdmann, N., Petroff, T., and Funnell, B.E. (1999) Intracellular localization of P1 ParB protein depends on ParA and parS. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 14905–14910.
- Garner, E.C., Campbell, C.S., and Mullins, R.D. (2004) Dynamic instability in a DNA-segregating prokaryotic actin homolog. *Science* **306**: 1021–1025.
- Gerdes, K., Moller-Jensen, J., and Bugge Jensen, R. (2000) Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol Microbiol* **37**: 455–466.
- Greene, E.C., and Mizuuchi, K. (2002) Dynamics of a protein polymer: the assembly and disassembly pathways of the MuB transposition target complex. *EMBO J* **21**: 1477–1486.
- Hayashi, I., Oyama, T., and Morikawa, K. (2001) Structural and functional studies of MinD ATPase: implications for the molecular recognition of the bacterial cell division apparatus. *EMBO J* **20**: 1819–1828.
- Hirano, M., Mori, H., Onogi, T., Yamazoe, M., Niki, H., Ogura, T., and Hiraga, S. (1998) Autoregulation of the partition genes of the mini-F plasmid and the intracellular localization of their products in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **257**: 392–403.
- Hu, Z., Gogol, E.P., and Lutkenhaus, J. (2002) Dynamic assembly of MinD on phospholipid vesicles regulated by ATP and MinE. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 6761–6766.
- Hunding, A., Ebersbach, G., and Gerdes, K. (2003) A mechanism for ParB-dependent waves of ParA, a protein related to DNA segregation during cell division in prokaryotes. *J Mol Biol* **329**: 35–43.
- Jensen, R.B., and Gerdes, K. (1997) Partitioning of plasmid R1. The ParM protein exhibits ATPase activity and interacts with the centromere-like ParR-parC complex. *J Mol Biol* **269**: 505–513.
- Jensen, R.B., Lurz, R., and Gerdes, K. (1998) Mechanism of DNA segregation in prokaryotes: replicon pairing by parC of plasmid R1. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 8550–8555.
- Klemm, R.D., Austin, R.J., and Bell, S.P. (1997) Coordinate binding of ATP and origin DNA regulates the ATPase activity of the origin recognition complex. *Cell* **88**: 493–502.
- Koonin, E.V. (1993) A superfamily of ATPases with diverse functions containing either classical or deviant ATP-binding motif. *J Mol Biol* **229**: 1165–1174.
- Lemonnier, M., Bouet, J.Y., Libante, V., and Lane, D. (2000) Disruption of the F plasmid partition complex in vivo by partition protein SopA. *Mol Microbiol* **38**: 493–505.
- Leonard, T.A., Butler, P.J., and Lowe, J. (2005) Bacterial chromosome segregation: structure and DNA binding of the Soj dimer – a conserved biological switch. *EMBO J* **24**: 270–282.
- Libante, V., Thion, L., and Lane, D. (2001) Role of the ATP-binding site of SopA protein in partition of the F plasmid. *J Mol Biol* **314**: 387–399.
- Lim, G.E., Derman, A.I., and Pogliano, J. (2005) Bacterial DNA segregation by dynamic SopA polymers. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 17658–17663.
- Lynch, A.S., and Wang, J.C. (1995) SopB protein-mediated silencing of genes linked to the sopC locus of *Escherichia coli* F plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1896–1900.
- Marston, A.L., and Errington, J. (1999) Dynamic movement of the ParA-like Soj protein of *B. subtilis* and its dual role in nucleoid organization and developmental regulation. *Mol Cell* **4**: 673–682.
- Moller-Jensen, J., Jensen, R.B., Lowe, J., and Gerdes, K. (2002) Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament. *EMBO J* **21**: 3119–3127.
- Mori, H., Mori, Y., Ichinose, C., Niki, H., Ogura, T., Kato, A., and Hiraga, S. (1989) Purification and characterization of SopA and SopB proteins essential for F plasmid partitioning. *J Biol Chem* **264**: 15535–15541.
- Motallebi-Veshareh, M., Rouch, D.A., and Thomas, C.M. (1990) A family of ATPases involved in active partitioning of diverse bacterial plasmids. *Mol Microbiol* **4**: 1455–1463.
- Quisel, J.D., Lin, D.C., and Grossman, A.D. (1999) Control of development by altered localization of a transcription factor in *B. subtilis*. *Mol Cell* **4**: 665–672.
- Raskin, D.M., and de Boer, P.A. (1999) MinDE-dependent pole-to-pole oscillation of division inhibitor MinC in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 6419–6424.
- Rodionov, O., and Yarmolinsky, M. (2004) Plasmid partitioning and the spreading of P1 partition protein ParB. *Mol Microbiol* **52**: 1215–1223.

- Rodionov, O., Lobočka, M., and Yarmolinsky, M. (1999) Silencing of genes flanking the P1 plasmid centromere. *Science* **283**: 546–549.
- Suefuji, K., Valluzzi, R., and RayChaudhuri, D. (2002) Dynamic assembly of MinD into filament bundles modulated by ATP, phospholipids, and MinE. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 16776–16781.
- Watanabe, E., Wachi, M., Yamasaki, M., and Nagai, K. (1992) ATPase activity of SopA, a protein essential for active partitioning of F-plasmid. *Mol Gen Genet* **234**: 346–352.
- Williams, D.R., and Thomas, C.M. (1992) Active partitioning of bacterial plasmids. *J Gen Microbiol* **138**: 1–16.
- Wong, I., and Lohman, T.M. (1993) A double-filter method for nitrocellulose-filter binding: application to protein–nucleic acid interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 5428–5432.
- Zheng, C., and Hayes, J.J. (2003) Intra- and inter-nucleosomal protein–DNA interactions of the core histone tail domains in a model system. *J Biol Chem* **278**: 24217–24224.

Supplementary material

The following supplementary material is available for this article online:

Table S1. SopA ATPase is activated by DNA and SopB.

Fig. S1. Inhibition of SopA polymerization.

Fig. S2. Sop protein producer plasmids.

This material is available as part of the online article from <http://www.blackwell-synergy.com>

1.B Caractérisation des filaments de SopA en présence du complexe de partition

L'étude présentée ci-dessus, nous a permis de montrer deux nouvelles activités pour SopA, l'activité de fixation non spécifique à l'ADN et la polymérisation. L'activité de fixation non spécifique à l'ADN a déjà été montrée pour la protéine ParA chromosomique de type Ib Soj mais est pour la première fois montrée ici pour une protéine ParA plasmidique de type Ia. Contrairement à SopA, Soj ne possède pas de motif de liaison à l'ADN de type HTH dans sa région N-terminale et reconnaît quand même l'ADN. Ceci suggère que ces deux protéines pourraient posséder un autre domaine de reconnaissance à l'ADN. Une étude récente révèle un domaine potentiel de reconnaissance de l'ADN dans la région C-terminale de SopA (Castaing et al., 2008). Les auteurs ont montré qu'un mutant de SopA (SopA-K340A) reconnaît toujours la région promotrice *sopOP*, mais ne reconnaît plus l'ADN en présence d'ATP.

L'activité de polymérisation a déjà été observée pour d'autres ParA de Type Ib telle que Soj de *T. thermophilus*, ParF de pTP228, ParA de pB171 (Barillà et al., 2005; Ebersbach et al., 2006; Leonard et al., 2005) (Figure 29 et 31). Récemment il a été montré que deux autres ParA de type Ia, ParA de P1 et ParA2 du chromosome 2 de *V. cholerae*, forment aussi des polymères *in vitro* (Dunham et al., 2009; Hui et al., 2010) (Figure 29 et 30). D'après ces observations, il semblerait que contrairement aux ParA des systèmes plasmidiques la présence d'ADN est nécessaire pour la polymérisation des ParA des systèmes chromosomiques car la polymérisation s'effectue sur l'ADN. Cependant une exception est observée pour l'homologue de ParA, δ_2 , du plasmide pSM19035 de *S. pyogenes* (Pratto et al., 2008). En effet, la polymérisation de δ_2 s'effectue sur l'ADN en présence d'ATP, mais nécessite aussi la présence de l'homologue ParB, ω_2 , à fort rapport ω_2/δ_2 (Figure 29). En absence de ω_2 , la polymérisation n'est pas observée. Les auteurs proposent que la fixation de ω_2 aux sites *parS* du plasmide après la réplication augmente la concentration locale de ω_2 et permet ainsi le recrutement de δ_2 sur l'ADN. En ce qui concerne SopA du plasmide F, l'ADN inhibe la formation des polymères. ParB seule stimule la formation des polymères de ParA et en présence d'ADN, grâce à son activité de fixation non spécifique, ParB masque l'ADN à SopA et enlève l'inhibition des polymères. Contrairement à δ_2 , Soj, et ParA2 qui forment des polymères sur l'ADN, les polymères de SopA ont été visualisés en ME en absence d'ADN. Je me suis intéressé à l'étude des polymères par des expériences d'observation en microscopie électronique, dans le but d'isoler des structures particulières et spécifiques des filaments de SopA en présence du complexe de partition.

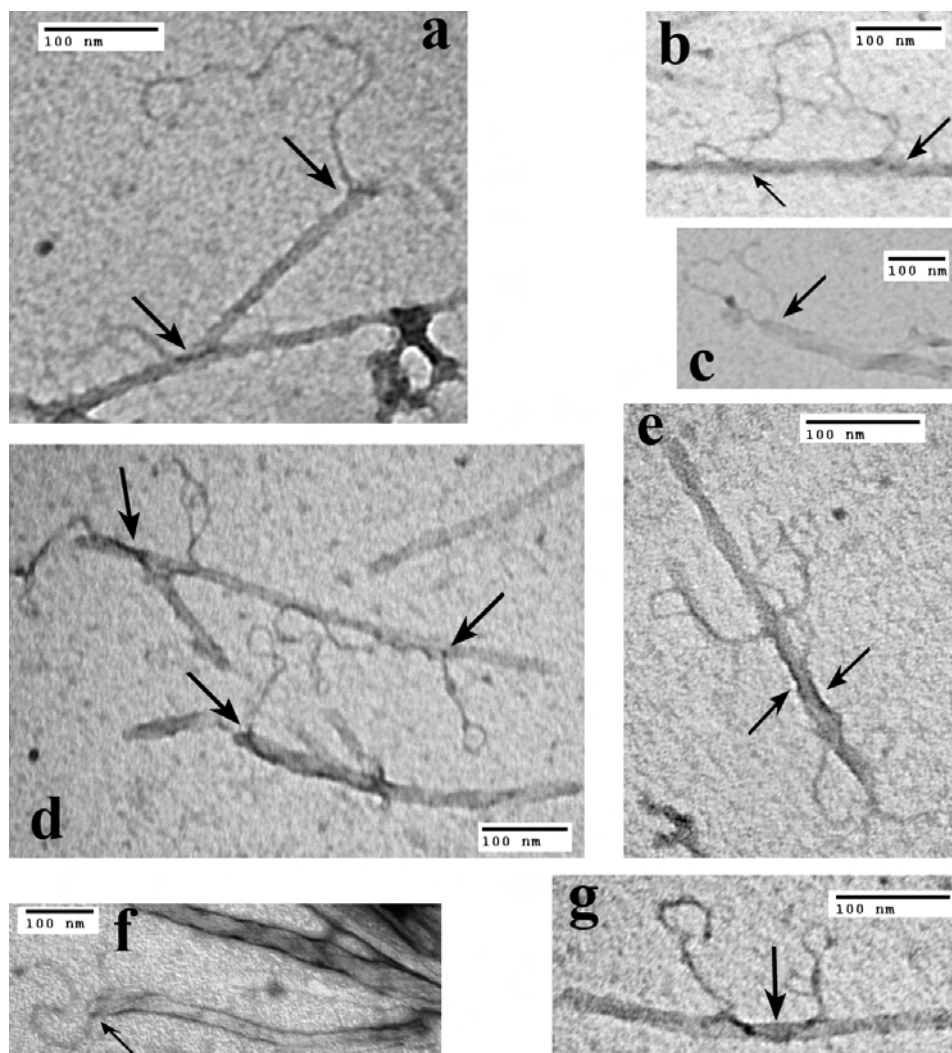


Figure 33 – Observation des filaments de SopA en présence du complexe de partition en microscopie électronique

SopA ($2 \mu\text{M}$) est incubée en présence de SopB ($1 \mu\text{M}$) et de *sopC* (pZC204 $0,6 \text{ nM}$) en présence d'ATP (1 mM). Les flèches indiquent la zone d'interaction entre l'ADN et les filaments. L'échelle est représentée sur chaque figure.

1.B.1 SopA forme des fibres en présence du complexe de partition

Au cours de cette étude, nous nous sommes heurtés à une difficulté. Il semblerait que les polymères soient instables *in vitro*. Nous avons essayé plusieurs conditions pour stabiliser les polymères, mais seule la multiplication des échantillons nous a permis d'avoir quelques observations exploitables. De ce fait, à cause de la non reproductibilité de ces données, mes résultats restent préliminaires. Ces résultats sont représentés sur la figure 33. La polymérisation de SopA est inhibée en fonction de la concentration d'ADN, mais en présence de SopB et d'ADN, la polymérisation de SopA n'est pas affectée (Bouet et al., 2007). Dans nos conditions, la présence du complexe de partition n'est donc pas inhibitrice de la polymérisation de SopA. Dans les expériences suivantes, nous avons ajouté le complexe de partition en incubant SopB avec la séquence complète du site centromérique *sopC* portée par un plasmide (pZC204). Dans ces conditions, les filaments observés en contact avec l'ADN sont structurés différemment (Figure 33a-g). Ils sont organisés en fibres droites de 20 à 40 nm d'épaisseur et peuvent atteindre des longueurs comprises entre 0,1 et 2 μm . Dans certains cas, des molécules d'ADN sont en contact avec le filament, et sont positionnées aléatoirement tout au long du filament. La zone de contact avec le filament peut être étendue (Figure 33d,e,g) ou limitée sur une petite région de l'ADN (Figure 33a,b,c,f). Parfois, deux molécules d'ADN sont retrouvées à des positions éloignées d'un même filament (Figure 33a,d). Les filaments ne sont pas observés en absence d'ATP, comme décrit précédemment (Bouet et al., 2007). Cette structure en forme de fibre adoptée par les polymères de SopA peut être conditionnée par SopB et l'ADN et donc dépendant de la présence du complexe de partition. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons recherché si SopA seule formait aussi des structures similaires.

1.B.2 Les fibres de SopA en absence du complexe de partition

En absence du complexe de partition, SopA forme également des fibres droites ou tressées entre elles donnant ainsi une forme spiralée aux filaments (Figure 34a-g). Ces fibres semblent d'une texture plus souple si on les compare aux fibres observées avec le complexe de partition. Elles atteignent des longueurs comprises entre 0,1 et 2 micromètres et leurs épaisseurs sont d'environ de 15, 30 ou 65 nm. Ce qui suggère que si une fibre unique mesure 15 nm d'épaisseur, les fibres de 30 et de 65 nm d'épaisseur peuvent être respectivement composées de 2 et de 4 fibres uniques. Ces résultats sont aussi considérés comme préliminaires, car les expériences sont

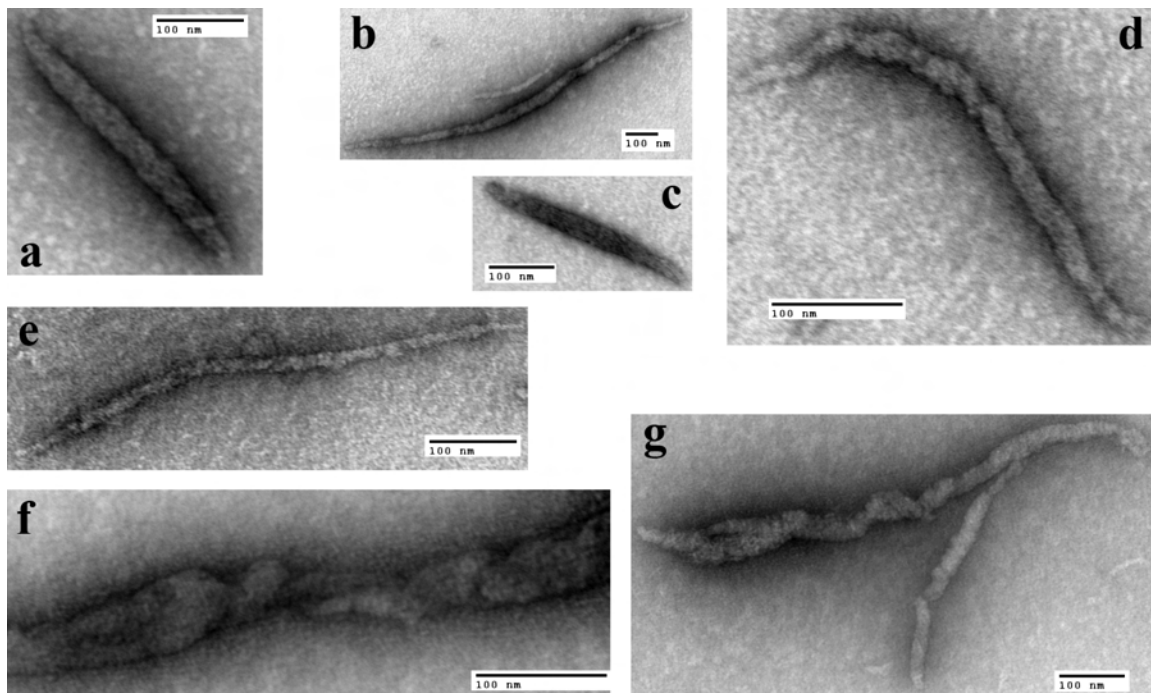


Figure 34 – Observation des filaments de SopA en présence d'ATP en microscopie électronique

SopA ($2 \mu\text{M}$) est incubée en présence d'ATP (1 mM). L'échelle est représentée sur chaque figure.

peu reproductibles à cause de l'instabilité des filaments.

1.B.3 Discussion

Les filaments de SopA en forme de fibre que nous avons pu observées au cours de cette étude sont différents des paquets de filaments caractérisés initialement. Il est possible que ces deux types de filaments existent *in vitro*. En effet, des formes de filaments différentes de celles observées pour SopA ont aussi été observées pour ParA de pB171 et pour ParA de P1 (Dunham et al., 2009; Ebersbach et al., 2006). Il a été montré que la protéine MinD une ATPase de la famille des « Walker Box » forme deux types de filaments *in vitro* : des filaments en forme de paquets comme pour SopA et ParF (Suefuji et al., 2002) ou des filaments en forme de tubes (Hu et al., 2002). Les paquets de filaments initialement observés pour SopA, pourraient être un état transitoire des filaments en forme de fibres. La polymérisation de SopA pourrait nécessiter un assemblage en plusieurs états avant d'atteindre une structure rigide capable de séparer les molécules d'ADN. De plus certaines fibres tressées de la figure 34 semblent être composées de plusieurs petites fibres, ce qui soutiendrait l'hypothèse de l'assemblage des polymères.

Les filaments observés en présence du complexe de partition paraissent plus rigides que ceux observés en absence du complexe de partition. Pour le système de partition du plasmide pTP228, il apparaît que ParG influence la polymérisation de ParF *in vitro* (Barilla et al., 2005). A faible rapport ParG/ParF, ParG agit comme un facteur stabilisant et permet la formation de filaments plus longs et plus épais qu'en absence de ParG. Pour le système de partition du chromosome deux de *V. cholerae*, la structure du filament de ParA2 est aussi influencée par la présence d'un facteur nucléotidique (Hui et al., 2010). En effet, ParA2 polymérise sur l'ADN en présence soit de l'ATP, soit de l'ADP ou en absence de nucléotide. Cependant, seul l'ATP permet une structure des filaments plus régulière et plus épaisse. Il est possible que SopB ou SopB fixée à *sopC* puisse influencer la structure des polymères en donnant à SopA une conformation différente de sa conformation adoptée en absence de ces deux protagonistes. Ce changement de conformation pourrait être une étape de contrôle de la partition, permettant ainsi de promouvoir la séparation des plasmides juste au moment où le substrat de la partition serait prêt à être ségrégué après la formation du complexe de partition.

Dans certains cas, nous avons observé que la zone de contact entre l'ADN et le filament de SopA peut s'étendre sur une grande région (Figure 33d,e,g). L'ADN inhibe la formation des polymères et SopB par son activité de fixation à l'ADN permet la polymérisation de SopA en masquant l'ADN. En admettant que nos observations sont confirmées, ces données suggèrent que le filament de SopA contacteraient

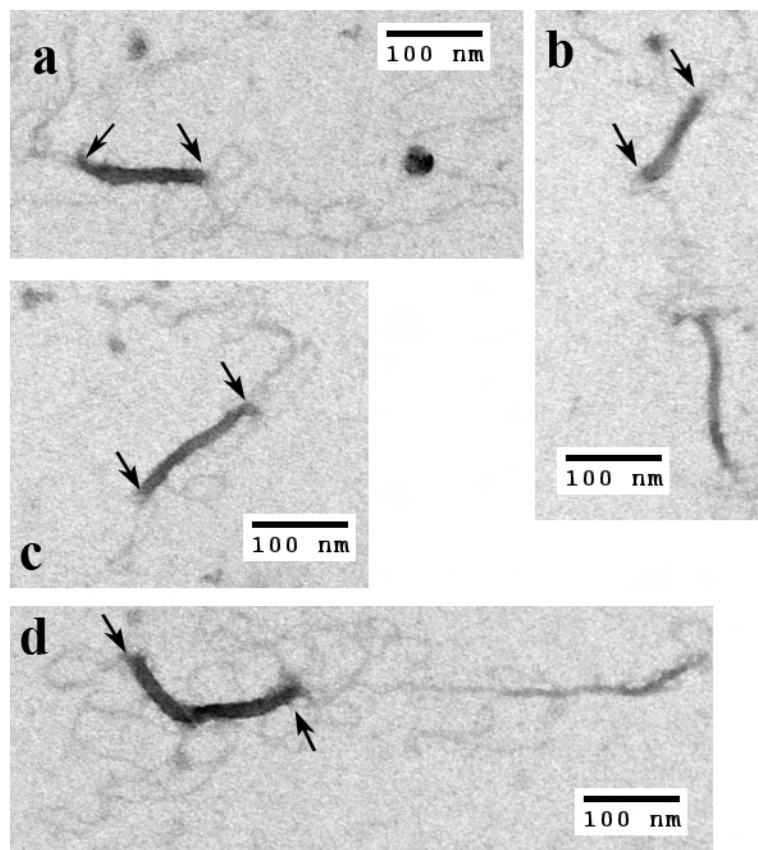


Figure 35 – Observation des filaments de SopA-D145A en présence du complexe de partition en microscopie électronique

SopA ($2 \mu\text{M}$) est incubée en présence de SopB ($1 \mu\text{M}$) et de *sopC* (pJYB57 1 nM) en présence d'ATP ($50 \mu\text{M}$). Les flèches indiquent la zone de contact entre l'ADN et les filaments. L'échelle est représentée sur chaque figure.

l'ADN par l'intermédiaire de SopB fixée à l'ADN. La grande région de contact avec l'ADN observée ici, pourrait représenter un complexe de partition étendu grâce à l'étalement de SopB sur l'ADN. Cette fonction de SopB permettrait non seulement la polymérisation de SopA, mais aussi augmenterait les chances de capture des molécules d'ADN par le filament. On peut imaginer que l'élongation du filament séparerait les molécules d'ADN. Des expériences en présence d'un plasmide ne possédant pas *sopC* devront être réalisées pour confirmer ces résultats.

Le principal problème rencontré au cours de cette étude est la reproductibilité des expériences. Pour confirmer ces résultats préliminaires, nous devons trouver des conditions pour stabiliser les filaments observés. Une alternative serait d'utiliser un traceur moléculaire comme par exemple des anticorps couplés à des billes d'or facilement repérables en ME. Cette technique nous permettrait de confirmer grâce à des anticorps reconnaissant spécifiquement SopA, si l'objet observé est composé de SopA. Une autre alternative consiste à utiliser un mutant de SopA (SopA-D145A) capable de polymériser, mais incapable d'hydrolyser l'ATP (Castaing, Lane, Bouet données non publiées). En effet, nous pensons qu'*in vivo* l'hydrolyse de l'ATP pourrait déstabiliser les filaments et que d'après les propriétés de cette protéine mutante, les filaments pourraient être stabilisés.

Cependant pour la coloration négative nécessaire pour les observations en ME, on utilise de l'acétate d'uranyle, un contrastant à pH acide. Ce contrastant peut être aussi la cause de l'instabilité des filaments observée *in vivo*. Néanmoins les premières observations réalisées avec ce mutant en présence du complexe de partition nous ont permis de mettre en évidence des fibres similaires aux fibres observées pour SopA (Figure 35). Ces fibres plus petites, de 100 à 200 nm de longueur, sont aussi en contact avec l'ADN. Cependant d'autres observations sont nécessaires pour confirmer ce résultat. La dernière alternative pour stabiliser les filaments, est l'étude des filaments en cryo-microscopie. Cette technique a l'avantage de congeler l'échantillon dans un milieu soluble et de faire des observations tout en gardant l'échantillon congelé.

A ce jour, le rôle des polymères des systèmes de partition de type I reste encore inconnu. Leur fonction pourrait être essentielle pour la partition. Une hypothèse est que ces polymères seraient à l'origine de la séparation des plasmides comme pour le système de partition de type II où ParM forme un filament qui pousse les plasmides à chaque pôle de la cellule. *In vivo*, SopA pourrait avoir le même comportement, c'est pourquoi, la caractérisation des filaments en présence du complexe de partition sera une étape importante pour la compréhension du mécanisme de partition plasmidique.

Chapitre 2

Régulation de l'activité ATPase de SopA

L'activité ATPase de SopA est importante pour la partition. Une mutation dans le domaine de fixation de l'ATP induit une déficience dans l'activité ATPase et entraîne un défaut de partition (Libante et al., 2001). Comme tous les ATPases ParA de type I, SopA possède une activité d'hydrolyse de l'ATP très faible qui est stimulée d'un facteur 1,4 par l'ADN, d'un facteur 5 par SopB et d'un facteur d'au moins 25 par SopB et l'ADN (Bouet et al., 2007). De ce fait, il était couramment admis que la stimulation de l'activité ATPase de SopA se faisait par l'intermédiaire d'une interaction SopB-ADN. Cependant la découverte de l'activité de fixation à l'ADN de SopA en présence d'ATP a remis en question ce mécanisme. Qui de SopA ou de SopB contacte l'ADN pour la stimulation de l'hydrolyse de l'ATP ? De plus, il a récemment été montré qu'un mutant de SopA (SopA-K340A) qui ne reconnaît plus l'ADN n'est plus stimulé efficacement pour l'hydrolyse de l'ATP (Castaing et al., 2008). L'article présenté dans ce chapitre développe l'étude du mécanisme de la stimulation de l'activité ATPase de SopA. Nous avons démontré que la stimulation de l'hydrolyse de l'ATP se fait par deux interfaces. SopA interagit d'une part avec l'ADN, et d'autre part avec SopB. Nous avons montré également que le complexe de partition est essentiel pour une stimulation optimale de l'activité ATPase.

Nous nous sommes intéressés ensuite à l'interaction SopA-SopB. En effet, la stimulation de plusieurs NTPases s'effectue par l'intermédiaire d'un motif arginine « finger ». Ce motif est caractérisé par un résidu arginine conservé qui interagit avec le groupement γ -phosphate du nucléotide fixé et qui se localise proche du site de fixation du nucléotide (Rittinger et al. 1997; Scheffzek et al. 1997 pour revue Scheffzek et al. 1998). L'arginine stabilise l'état de transition de la réaction d'hydrolyse des NTP en neutralisant les charges négatives générées au cours du transfert des phosphates et fonctionne comme un commutateur pour le changement de conforma-

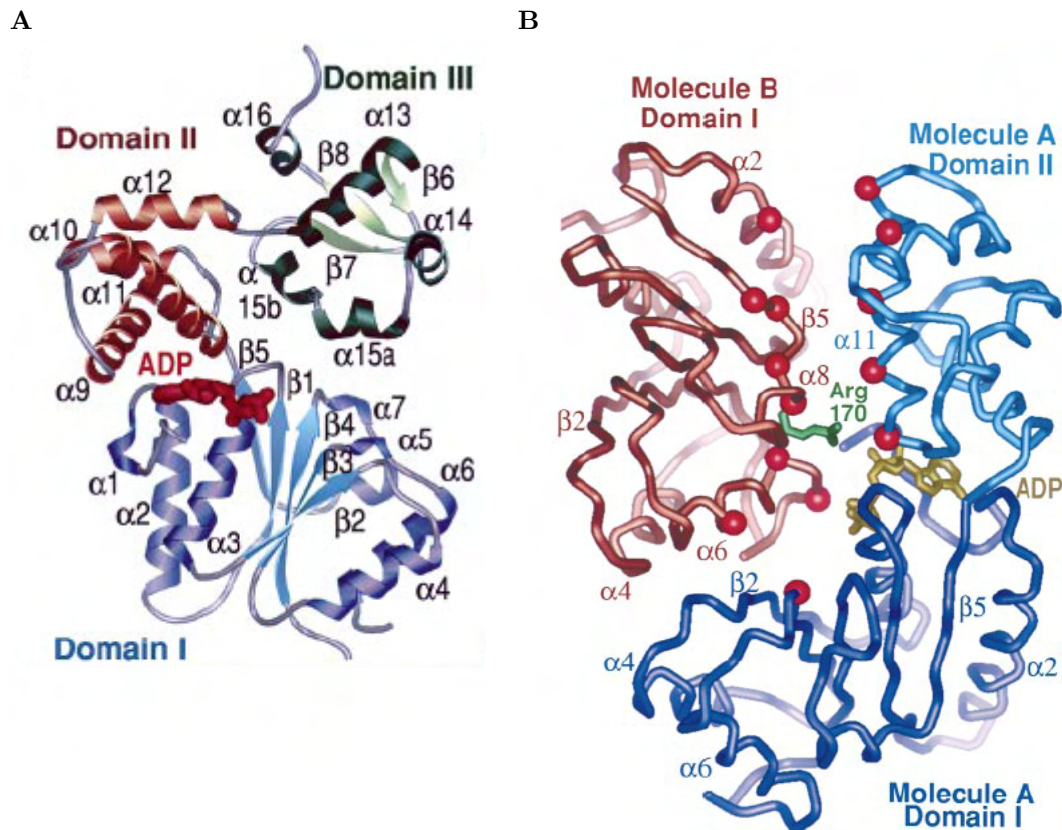
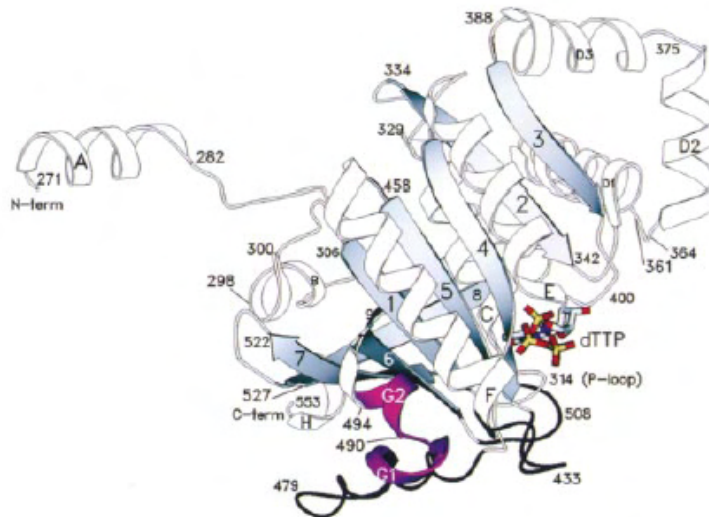


Figure 36 – Représentation de la structure de RuvB fixé à l'ADP
 A) Structure d'un monomère de RuvB complexé à l'ADP. B) Interface hexamérique entre deux sous unités adjacentes d'un hexamère de RuvB. L'arginine « finger » R170 (vert) de la molécule B approche le nucléotide (jaune) fixé par la molécule A. (Extrait de Putnam et al. 2001).

tion après l'hydrolyse des NTPs (Nadanaciva et al., 1999; Rittinger et al., 1997; Scheffzek et al., 1997). Selon les enzymes, l'arginine « finger » peut être localisé soit sur une autre protéine activatrice, comme par exemple pour les GTPases eucaryotes RAS et leur protéines activatrices GAP (Rittinger et al., 1997), pour ParF de pTP228 et son activateur ParG (Barillà et al., 2007) soit sur une sous unité adjacente de la protéine qui agit en *cis* ou par oligomérisation, comme pour l'ATPase F1 d'*E. coli* (Nadanaciva et al., 1999), les hélicases : PcrA de *Bacillus stearothermophilus* (Soultanas et al., 1999), Gp4 du bactériophage T7 (Crampton et al., 2004), RuvB de *Thermotoga maritima* (Putnam et al., 2001), RepA du plasmide RSF1010 (Niedenzu et al., 2001) et Rep40 de AAV2 (adeno-associated virus 2) (James et al., 2003). L'étude de la structure de ces protéines montre que ce motif arginine « finger » est localisé à proximité du γ -phosphate du nucléotide fixé (Figure 36, 37 et 38) (James et al., 2003; Niedenzu et al., 2001; Putnam et al., 2001; Sawaya et al., 1999).

L'identification d'un motif arginine « finger » n'est pas possible par une étude de recherche d'homologie. Cependant ce motif doit suivre trois critères (Scheffzek et al., 1998) : (i) le résidu arginine doit être conservé dans la sous-famille des protéines portant ce motif; (ii) le résidu ne peut-être remplacé par un autre résidu basique; (iii) les mutations de ce résidu doivent abolir la stimulation de l'activité des NTPases sans affecter les interactions entre les deux protéines partenaires. Plusieurs études ont montré qu'une mutation de ce résidu induit une déficience dans l'activité de la NTPase (Tableau 1). Au vu de l'implication de SopB dans la stimulation des activités de SopA, il serait possible que SopB possède un motif arginine « finger » nécessaire pour l'activation de l'ATPase. Dans cette étude, nous avons également montré que ce motif existe chez SopB et qu'il est nécessaire pour la stimulation de l'activité ATPase SopA.

A



B



Figure 37 – **Représentation de la structure de l'hélicase Gp4 fixé au dTTP**
 A) Structure d'un monomère de l'hélicase Gp4 du bactériophage T7 complexé au dTTP. B) Interaction entre deux sous-unités voisines des domaines de l'hélicase Gp4. L'arginine « finger » R522 d'une sous-unité (flèche rouge) est positionné est positionné proche du nucléotide fixé par l'autre sous-unité. (Extrait de Nadanaciva et al. 1999).

Protéines	Résidu arginine (R) « finger »	Mutations	Référence
ParG	R19	alanine, lysine	Barilla et al. 2007
ATPase F1	R376	glutamine, cystéine, lysine	Nadanaciva et al. 1999
PcrA	R610	alanine	Soultanas et al. 1999
Gp4	R522	alanine, lysine	Crampton et al. 2004
RuvB	R170	alanine, lysine	Putnam et al. 2001
Rep40	R444	alanine	James et al. 2003

Tableau 1 – Liste des mutations réalisées sur certains motif arginines « finger » bactérien

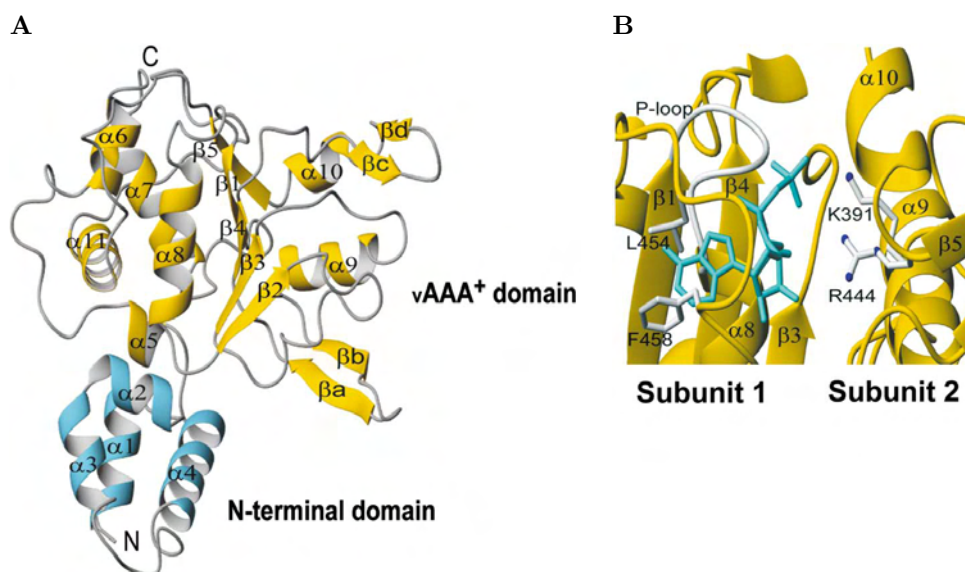


Figure 38 – Représentation de la structure de Rep40 de AAV2

A) Structure d'un monomère de Rep40 de AAV2. B) Interface entre deux monomères adjacents, complexés dans un hexamère de Rep40. L'arginine « finger » R444 de la sous-unité 2 est à proximité de l'AMP-PNP (bleu) fixé par la sous-unité 1. (Extrait de James et al. 2003).

2.A Présentation de l'article : « Dual role of DNA in regulating ATP hydrolysis by the SopA partition protein »

Dual Role of DNA in Regulating ATP Hydrolysis by the SopA Partition Protein^{*[S]}

Received for publication, July 15, 2009, and in revised form, September 8, 2009. Published, JBC Papers in Press, September 8, 2009, DOI 10.1074/jbc.M109.044800

Yoan Ah-Seng^{†§1}, Frederic Lopez^{¶1}, Franck Pasta^{‡§}, David Lane[‡], and Jean-Yves Bouet^{†§2}

From the [†]Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires, CNRS, F-31000 Toulouse, France, the [§]Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires, Université Paul Sabatier, F-31000 Toulouse, France, and the [¶]Institut L. Bugnard-INSERM-CHU Rangueil, F-31000 Toulouse, France

In bacteria, mitotic stability of plasmids and many chromosomes depends on replicon-specific systems, which comprise a centromere, a centromere-binding protein and an ATPase. Dynamic self-assembly of the ATPase appears to enable active partition of replicon copies into cell-halves, but for Walker-box partition ATPases the molecular mechanism is unknown. ATPase activity appears to be essential for this process. DNA and centromere-binding proteins are known to stimulate the ATPase activity but molecular details of the stimulation mechanism have not been reported. We have investigated the interactions which stimulate ATP hydrolysis by the SopA partition ATPase of plasmid F. By using SopA and SopB proteins deficient in DNA binding, we have found that the intrinsic ability of SopA to hydrolyze ATP requires direct DNA binding by SopA but not by SopB. Our results show that two independent interactions of SopA act in synergy to stimulate its ATPase. SopA must interact with (i) DNA, through its ATP-dependent nonspecific DNA binding domain and (ii) SopB, which we show here to provide an arginine-finger motif. In addition, the latter interaction stimulates ATPase maximally when SopB is part of the partition complex. Hence, our data demonstrate that DNA acts on SopA in two ways, directly as nonspecific DNA and through SopB as centromeric DNA, to fully activate SopA ATP hydrolysis.

Faithful segregation of low copy number plasmids in bacteria depends on partition loci, named Par. Such loci are composed of two genes, generically termed *parA* and *parB*, encoding an ATPase and a DNA-binding protein, respectively, and a *cis*-acting centromeric site *parS* (reviewed in Ref. 1). These three essential elements are sufficient for the partition process. ParBs assemble on *parS* to form nucleoprotein structures called partition complexes (2–6). ParA ATPases are considered to be motors that direct displacement and positioning of partition complexes inside the cell.

Partition systems have been classified into two major types, distinguished by the nature of their ATPase proteins (7). Type I

is characterized by Walker box ATPases, which are specified by many plasmids and most bacterial chromosomes. In some (Type Ia) the nucleotide-binding P-loop is preceded by an N-terminal regulatory domain, in the others (Type Ib) it is not. Type II specifies actin-like ATPases and is present on relatively few plasmids. It is presently the best understood system at the molecular level (8–10). However, the underlying mechanism that drives partition still remains elusive for both systems. Our work aims at the understanding of an archetypal representative of Type Ia, namely SopABC of the *Escherichia coli* plasmid F.

The several activities of Type Ia ParA proteins are regulated by binding of adenine nucleotides (11, 12), which induce conformational changes in the proteins (13, 14). In their apo and/or ADP-bound forms these proteins display site-specific DNA binding activity, recognizing their cognate promoters through their N-terminal domains. Such activity is involved in the auto-regulation of *par* operon expression (15, 16). In the ATP-bound form, they specifically interact with cognate partition complexes through contact with ParB proteins. The ATP-bound form of type I ParAs spontaneously forms polymers, which appear as bundled filaments in electron micrographs (12, 17–19). The role of these filaments is not understood but they could be related to the rapid movement of partition complexes in the cell. *In vivo*, ParA proteins form dynamic assemblies that move back and forth in the cell if the cognate ParB protein and *parS* centromere are present (20–23). The link between this oscillatory behavior and the segregation of partition complexes is not clear. They both require the ATPase activity of ParA proteins but the role of ATP hydrolysis in the partition process is not understood.

It has long been known that ParA partition proteins exhibit low intrinsic ATPase activity (24, 25). ATP hydrolysis is modestly stimulated by either DNA or the cognate ParB alone but is strongly activated (up to 35-fold) when both DNA and ParBs are present (12, 24, 25). The lack of major stimulation of ATPase by DNA in the absence of ParB proteins has been taken to mean that the DNA-bound form of ParB is the effective activator (26). However, incorporation of centromere sites in the DNA added to ParB did not increase stimulation of ATPase (24, 25), leaving doubts as to the role of the partition complex in ATPase activation.

The mechanism by which ATP hydrolysis acts in the partition process is not known for type I systems. This is in marked contrast to actin-based partition ATPases whose ATPase activity is stimulated in growing filaments (8), where it provokes the rapid disassembly of filaments unless these are capped by the

* This work was supported by l'Agence Nationale de la Recherche Grant ANR-06-BLAN-0280-01.

[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1 and S2 and Table S3.

¹ Supported by a bourse de thèse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

² To whom correspondence should be addressed: LMG, CNRS, Université Paul Sabatier, Bât. IBCG, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9, France. Tel.: 33-561-335-906; Fax: 33-561-335-886; E-mail: jean-yves.bouet@ibcg.biotoul.fr.

Partition ATPase Activation by Partition Complex and DNA

cognate partition complex (9). Therefore, for the type II partition system, ATP hydrolysis ensures discrimination between unproductive filaments that are rapidly disassembled and productive filaments that drive partition complexes to opposite ends of the cell. This dynamic instability, which ensures elongation of actin-like filaments only between two partition complexes to be segregated, thus provides regulation of the partition process.

Recently, it has been shown that two members of the type I ParA family, Soj of *Thermus thermophilus* and SopA of plasmid F, bind nonspecific DNA in the presence of ATP (12, 26). Two studies revealed that this DNA binding activity is essential for partition (27, 28). Importantly, it has been shown that a SopA mutant deficient in DNA binding no longer stimulates ATP hydrolysis efficiently, suggesting that DNA could play a direct role in the regulation of the ATPase activity (28). This finding raises the issue of the interactions required for activation of the type I partition ATPase activity by cognate proteins and DNA.

In this study, we have investigated the mechanism of activation of ATP hydrolysis by SopA. First, we have found that the formation of the F partition complex is required for strong stimulation of the SopA intrinsic ATPase activity. We have also found that the partition complex and DNA stimulate ATP hydrolysis independently but that these two independent interactions act in synergy to amplify SopA ATPase activity. Lastly, we have identified an arginine finger motif in SopB responsible for the stimulation of SopA ATPase activity.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmids and *sopB* Mutagenesis—Plasmids used are listed in supplemental Table S3). pJYB57 was made by inserting the *sopC* sequence, amplified by PCR from pDAG114 (29), into pBSKS(+) using EcoRV and EcoRI restriction sites. pYAS6 is a pTYBI derivative (NEBioLabs) into which, the *sopB*-G324 gene, PCR amplified from pDAG170 (30), was inserted using NdeI and SapI restriction sites. *sopB* mutations were introduced into pYAS6 by mutagenic primer-directed replication using the Stratagene QuikChange kit and were verified by sequencing.

Protein Purification—Native SopA protein was purified as described (12). Intein-tagged SopB-G324 and mutant proteins were purified from strain C2833 (NEBioLabs) as follows: overnight cultures grown at 30 °C in LB were diluted 100-fold and incubated at 42 °C. At A_{600} 0.5–0.8, isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside was added to 0.4 mM; incubation was continued at 30 °C for 4 h or, for SopB^{*1/*2/*3}, at 20 °C for 16–20 h. Cells were lysed by sonication in B buffer (20 mM Hepes-KOH pH 7.8, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA) containing 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozyme. The lysate was loaded onto a 5-ml chitin column and washed successively with 15 ml of B buffer, 50 ml of 1 M NaCl in B buffer, and 15 ml of B buffer. The column was then quickly equilibrated with 15 ml of 50 mM dithiothreitol in B buffer, and stored at 4 °C for 16–20 h to allow protein cleavage. After elution, proteins were dialyzed against S buffer (12), loaded onto a mono-S column (Amersham Biosciences) and eluted with a 50–600 mM KCl gradient in S buffer. SopB fractions were kept at –80 °C. SopB-N52 was purified as an intein-tagged peptide as above, except that the final mono-S step was replaced by an amicon ultra 15–30K concentration step, and the flow-through

was concentrated on a Vivaspin 6K filter device (Sartorius). SopB-N52 was quantified by NMR³.

ATPase and Electromobility Shift Assays—ATPase assays and electromobility shift assays (EMSA)³ were performed essentially as described (12). Reaction mixtures for ATPase assays were incubated at 37 °C for 4 h. Chromatographs were developed with 1 M formic acid/0.5 M LiCl. EMSA were performed using 1 nM radiolabeled DNA probes, and binding reaction products were resolved at 4 °C by electrophoresis on 6% polyacrylamide gels in TGE (25 mM Tris base, 190 mM glycine, 10 mM EDTA) for 4 h at 180 V.

Surface Plasmon Resonance Assays—Binding and kinetic studies were performed using a Biacore 3000. Immobilization steps of biotinylated DNA probes, performed on a streptavidin-coated sensorchip in HBS-EP buffer (10 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% surfactant P20), were stopped when 498 RU of 136-bp DNA probe (reference) and 503 RU of 136-bp *sopC* DNA probe were obtained. Binding analyses were performed with multiple injections of different protein concentrations at 25 °C. Samples, diluted in BD buffer (20 mM Hepes-KOH pH 7.4, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ sonicated salmon sperm DNA, 1 mM dithiothreitol), were injected at 10 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ over both sensor surfaces at the same time for 180 s. Reference sensorgrams were subtracted from sensorgrams obtained with the 136-bp *sopC* DNA probe to yield true binding responses. Kinetic constants were calculated using BIAevaluation 4.0.1 software.

RESULTS

Centromeric DNA Is Required for Maximal ATPase Activation—To determine whether DNA could play a direct role in SopA ATPase activity, we first standardized our ATP hydrolysis assay. The results in Fig. 1A (left panel) show that the intrinsic SopA ATPase activity (0.3 mol/h/mol) is moderately activated both by DNA (2-fold) and by SopB (~3-fold) and is highly activated (43-fold) when nonspecific DNA (NS DNA) and SopB are added together. These results are equivalent to those obtained previously (12, 24, 25). However, in contrast to previous reports that ATPase stimulation was indifferent to the presence of the cognate centromere (24, 25), we found that use of *sopC*-containing DNA with SopB raised the level of ATPase activation to 122-fold (36 mol/h/mol), 3 times higher than with NS DNA (Fig. 1A). Without SopB, such activation does not occur. The disparity between this and the earlier observations motivated us to clarify the “centromeric effect” observed in our conditions.

We assayed SopA ATPase activity in the presence of SopB as a function of DNA concentration (Fig. 1B). ATP hydrolysis increased in proportion to DNA concentration with both NS and *sopC*-containing DNA, reaching a plateau of maximal activation around 80 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. At this saturating DNA concentration, *sopC*-containing DNA still activates ATP hydrolysis to a 2.5-fold higher level than NS DNA, indicating that centromeric DNA is needed for maximal ATPase stimulation in our assay conditions.

³ The abbreviations used are: EMSA, electromobility shift assay; hth, helix turn helix; NS-DNA, nonspecific DNA; R-finger, arginine finger; SPR, surface plasmon resonance; RU, resonance unit; wt, wild type.

Partition ATPase Activation by Partition Complex and DNA

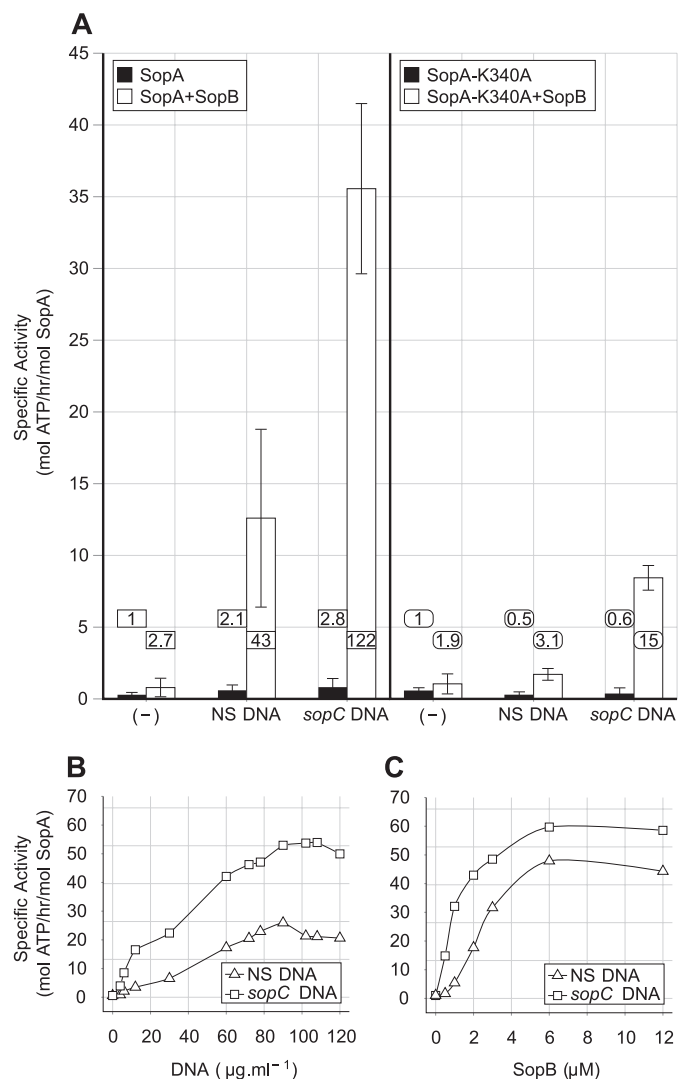


FIGURE 1. Characterization of SopA ATPase activity. Reaction mixtures contained 2 μM SopA or SopA^{K340A} and, except as indicated, 2 μM SopB and 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ nonspecific (NS; pBSKS) or *sopC*-containing (pJYB57) plasmid DNA. For each value the corresponding control value without SopA has been subtracted. **A**, ATP hydrolysis by SopA proteins. SopA (left panel) or SopA^{K340A} (right panel) were incubated alone (black bars) or with SopB (white bars) in the absence of DNA (-) or the presence of NS or *sopC*-containing DNA. Stimulation factors, normalized to 1 for SopA or SopA^{K340A} alone, are shown inside or above bars. Error bars for standard deviations from at least 20 (SopA) and 3 (SopA^{K340A}) independent experiments. **B**, DNA concentration dependence of SopA ATPase activity. Reaction mixtures contained SopA in the presence of SopB and increasing concentrations of NS (triangle) or *sopC*-containing DNA (square). **C**, SopB concentration dependence of SopA ATPase activity. Reaction mixtures contained SopA and NS (triangle) or *sopC*-containing DNA (square) and increasing concentrations of SopB.

We then measured SopA ATP hydrolysis as a function of SopB concentration (Fig. 1C). ATPase activity rose sharply with increasing SopB concentration, reaching maximal activation at 6 μM . At this activation plateau ATP hydrolysis is still 35–40% higher with *sopC*-containing DNA than with NS DNA. At lower SopB concentrations, centromeric DNA is a much better ATPase activator than NS DNA; at 1 μM SopB, *sopC*-containing DNA activates SopA ATPase 6 times more strongly than NS DNA. Thus, the lower the concentration of SopB the more important *sopC* becomes for efficient activation of SopA ATPase. Taken together, these observations suggest strongly

that the F partition complex, SopB bound to *sopC* centromere, is required for full activation of SopA ATPase activity, and reinforce the idea that the DNA-bound form of SopB is the effective activator.

Diminished ATPase Activation of a SopA DNA Binding Mutant—To examine the influence of DNA on SopA ATP hydrolysis we took advantage of a recently identified SopA mutant, SopA^{K340A}, impaired in ATP-dependent DNA-binding but still able to interact with SopB (28). Like wt, its basal ATPase activity was stimulated ~2-fold by SopB (Fig. 1A, right panel). In contrast to wt SopA however, no stimulation was observed in the presence of DNA. Moreover, addition of NS DNA in the presence of SopB results in only weak activation (3-fold), 14-times less than with wt SopA, confirming that the SopA^{K340A} DNA binding mutant is severely impaired in ATPase activation (28). When *sopC*-containing DNA was present along with SopB, SopA^{K340A} ATPase activity increased only 15-fold, much less than the 122-fold observed with wt SopA. These data indicate that in conditions supporting maximal stimulation of wt SopA, SopA^{K340A} ATPase is not activated by DNA other than indirectly through SopB.

Because interaction of SopA^{K340A} with SopB is unimpaired (28), the strong reduction in ATPase stimulation stems from the protein DNA binding deficiency, indicating direct involvement of DNA in activation of SopA ATPase activity. Hence the view that DNA stimulates SopA ATP hydrolysis by binding to SopB appeared too simple, and the question of whether DNA stimulates SopA ATPase independently or through SopB remained open.

Characterization of SopB DNA Binding Mutants—To determine whether DNA can also stimulate SopA ATPase via SopB, we constructed SopB mutants deficient in DNA binding. SopB recognizes *sopC* through a helix-turn-helix (hth) motif comprising residues 178 to 198. SopB¹, mutated in the first helix (A183P) is expected to lose DNA binding activity and SopB², mutated in the recognition helix (K191A-R195A) is expected to lose *sopC*-specific binding. Binding of the purified SopBs to specific (*sopC*) and nonspecific (NS) DNAs in the presence and absence of competitor DNA was analyzed by EMSA (Fig. 2). WT SopB binding is illustrated in Fig. 2A and quantitation of wt and mutant SopB binding is shown in Fig. 2B. To summarize, binding of the SopB mutants conformed to that expected if binding affinity is determined largely by the first helix and specificity by the second. Thus, with competitor present SopB¹ retained some ability to retard *sopC* but SopB² did not. When the wt first helix of SopB² is no longer sequestered by competitor its binding to both *sopC* and NS DNAs exceeds that of SopB¹ even while the latter continues to bind preferentially to *sopC*. A third mutant, SopB³ (A183D-K191A-R195A), made by combining mutated positions, was both unable to differentiate NS and *sopC* DNAs and even less active in DNA binding. The distinct DNA-binding character of these three SopB variants enabled us to investigate the interactions required for SopA ATPase activation.

DNA Can Activate SopA ATPase Independently of SopB—The three SopB variants were assayed for activation of SopA ATPase activity (Fig. 3). Without DNA, the SopB mutant deficient in *sopC*-specific binding, SopB², activated ATP hydroly-

Partition ATPase Activation by Partition Complex and DNA

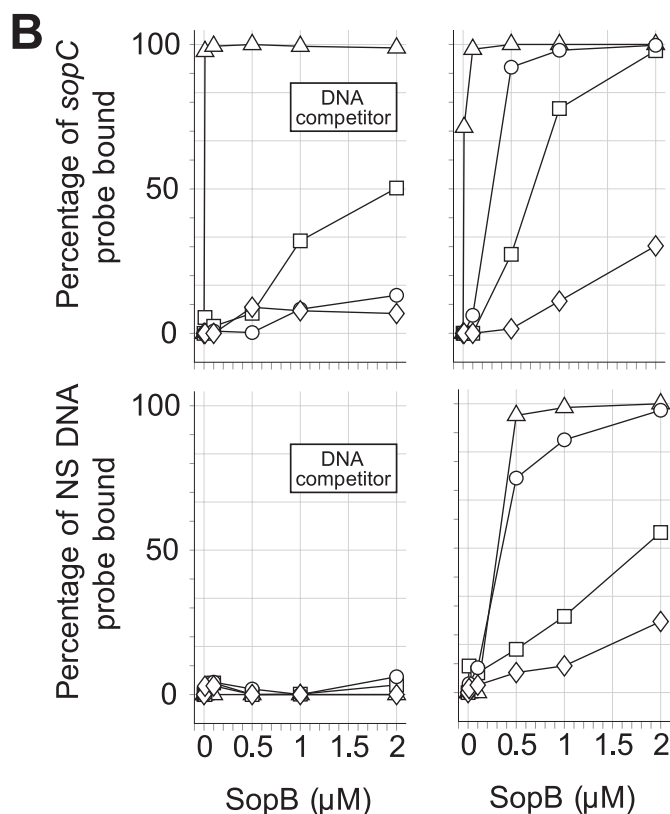
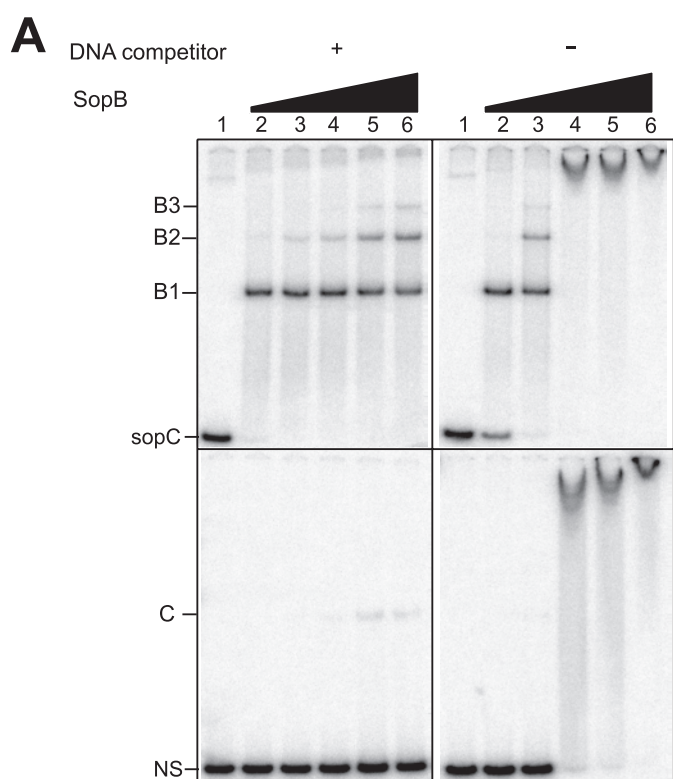


FIGURE 2. DNA binding properties of wild-type SopB and hth mutants. *A*, retardation of SopB-DNA complexes. ^{32}P -labeled *sopC* (top panels) or NS (bottom panels) DNA probes were incubated alone (lane 1) or with increasing concentrations of SopB (lanes 2–6; 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2 μM) in the presence (+; left panels) or absence (–; right panels) of 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ competitor DNA. Reaction mixtures were analyzed by electrophoresis on polyacrylamide gels. Positions of DNA probes and protein complexes are indicated on the left. B1, B2, and B3 denote specific complexes. C denotes a nonspecific complex. *B*, DNA

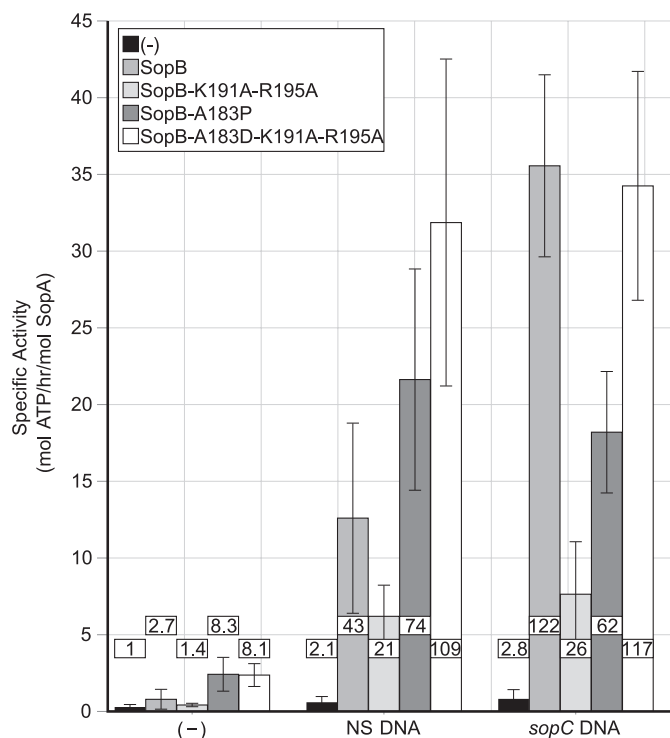


FIGURE 3. Activation of SopA ATPase activity by SopB hth mutants. Reaction mixtures contained 2 μM SopA, 2 μM SopB (defined in *inset*), and either DNA (–) or 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ NS DNA (pBSKS) or *sopC*-containing DNA (pJYB57). For each value the corresponding control value without SopA has been subtracted. Error bars are standard deviations from at least three independent experiments. Stimulation factors, normalized to 1 for SopA alone, are shown in boxes inside or above bars.

sis slightly (1.4-fold), like wt. With either NS or *sopC*-containing DNA, SopB² strongly enhanced ATP hydrolysis, 21- and 26-fold, respectively. The 3-fold stimulatory effect of *sopC* observed with wt SopB was not seen with SopB², consistent with the need for direct SopB-*sopC* interaction in maximal ATPase activation.

Proteins, SopB¹ and SopB³, whose mutated Ala-183 position weakens DNA binding, showed an intrinsic ATPase activation ability \sim 3-fold higher than wt. (Fig. 3). In the presence of either NS or *sopC*-containing DNA they both strongly activated SopA ATPase activity (60–120-fold). Hence, the need for DNA in SopB-mediated stimulation of SopA ATPase is bypassed with these mutants (see last section). The possibility that residual DNA binding by SopB³ enables this mutant to activate ATPase was excluded by showing that it failed to do so with the SopA^{K340A} DNA-binding mutant (not shown). These data indicate that stimulation of ATP hydrolysis occurs also via direct contact between SopA and DNA, and therefore that two independent interactions are required for SopA ATPase activation, one with SopB and another with DNA.

SopB Activates SopA ATPase through an Arginine Finger Motif—Nucleotide hydrolysis by many NTPases is stimulated by an arginine finger (R-finger) motif (31). The R-finger is usu-

ally involved in the binding properties of SopB wt and hth mutants. EMSAs were performed as in *A*. After electrophoresis, bands were quantitated and percentage of total probe bound was calculated. WT SopB (triangle), SopB¹ (square), SopB² (circle), or SopB³ (diamond) were incubated with *sopC* (top panels) or NS (bottom panels) DNA probes in the presence (left panels) or absence (right panels) of 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ competitor DNA.

Partition ATPase Activation by Partition Complex and DNA

ally located in flexible loops, either *in cis* on the same polypeptide chain or *in trans* provided by a partner protein, that can enter the catalytic pocket and stabilize the transition state through neutralization of the negative charges generated during phosphoryl transfer. Identification of R-fingers is not possible by direct homology search but a comprehensive survey by

Scheffzek *et al.* (1998) concluded that they must fulfil the following criteria: (i) they are invariant within a subfamily of GTP/ATP-activating proteins; (ii) they cannot be functionally replaced, even by a basic residue; and (iii) mutations should abrogate stimulatory activity without affecting interaction of the two partner proteins.

The requirement for SopB in ATPase activation suggests that SopB could provide such an R-finger motif *in trans*. Residues important for specificity of SopB-SopA interaction were shown to reside in the first 42 amino acids of SopB (32). We purified a peptide composed of the first 52 amino acids of SopB, SopB-N52, and assayed its ability to activate SopA ATPase (Fig. 4B). In the absence of DNA, SopB-N52 stimulated basal SopA ATPase activity modestly; at 20 μM , ATP hydrolysis increased ~ 4 -fold. In the presence of DNA, either with or without *sopC*, ATPase activity was strongly activated by SopB-N52. Maximal activation, reached at 20 μM , was comparable to that obtained with full-length SopB in the presence of DNA (Fig. 1C). Therefore, the SopB ATPase activation domain is present within its first 52 amino acids. Although the SopB-N52 peptide does not carry the hth DNA binding domain, it exhibits NS DNA binding activity at concentrations above 5 μM . However, this NS DNA binding activity is salt-sensitive and is barely detectable above 150 mM KCl (supplemental Fig. S1). By contrast, SopA ATP hydrolysis is still fully stimulated by SopB-N52 in the presence of DNA at 200 mM KCl, where SopB-N52 does not bind DNA. These data confirm that direct interaction of DNA with SopA is important for activation of SopA ATPase.

Three arginine residues are present in SopB-N52 (Fig. 5). We tested two of them, Arg-36 and Arg-42, (excluding the extreme N-terminal one as unlikely) for stimulation of SopA ATPase by mutation to alanine and lysine. The purified mutant SopB proteins were fully functional for binding to *sopC* DNA (data not shown). SopB^{R42A} showed a diminished ability to activate SopA ATPase (Fig. 4A); none in the absence of DNA and a 6-fold reduction in the presence of either NS or *sopC* DNA compared with wt SopB. Thus, residue Arg-42 is important for ATPase stimulation. However, the other variant, SopB^{R42K}, activated SopA ATPase activity to the levels obtained with wt SopB, both with and without DNA (Fig. 4A), indicating that although Arg-42 is involved in SopA ATPase activation, it is not an R-finger as defined by Scheffzek *et al.* (31) (criterion (ii) above).

Neither of the Arg-36 mutants was able to stimulate SopA ATPase in the absence of DNA (Fig. 4A). With NS DNA, SopB^{R36A} and SopB^{R36K} exhibited 17- and 8-fold reduction, respectively, in SopA ATPase stimulation compared with wt SopB. With *sopC*-containing DNA, the loss of activation was still high (21-fold) for SopB^{R36A} and moderate (5-fold) for SopB^{R36K}. Thus, in contrast to Arg-42, Arg-36 cannot be fully replaced for SopA ATPase stimulation even by lysine. This strongly suggests that SopB

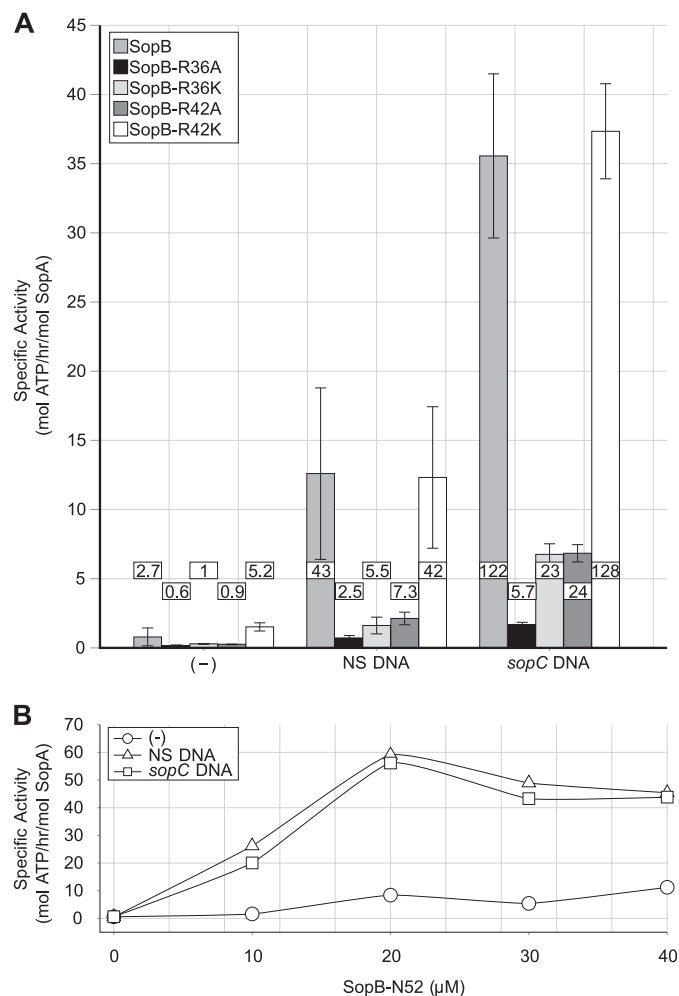


FIGURE 4. Activation of SopA ATPase activity by (A) SopB arginine mutants (*inset*) and (B) a SopB N-terminal peptide. Assay conditions and data treatment are as described in the legend to Fig. 3.

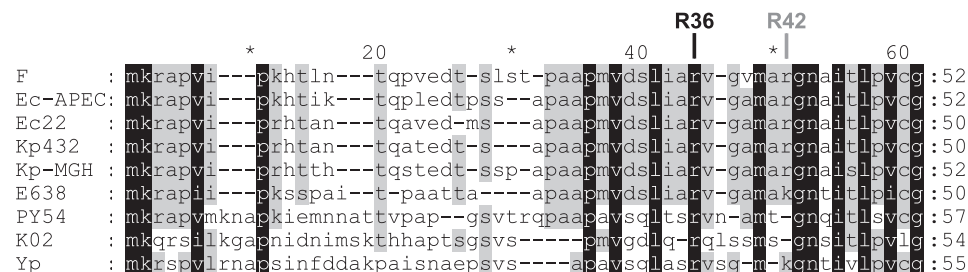


FIGURE 5. Alignment of partial amino acid sequences of ParB homologs. ParB members very closely related to SopB of plasmid F were found in the data base using the Blast algorithm. Nine of them, present on plasmids or phages, having $>30\%$ amino acid identity in the N terminus ($>45\%$ in the whole sequence), display an arginine corresponding to SopB-R36. SopB homologs of identical N-terminal sequences were not included. In the aligned sequences, conserved residues and conservative substitutions (V/I/L, T/S, and R/K) are shaded in black if present in all sequences or in gray if present in five or more sequences. The arginine residues denoted R36 and R42 refer to SopB of F. Plasmid partitioning proteins are from *E. coli* APEC O1 (*Ec-APEC*), *E. coli* K12 (F), *E. coli* E22 (*Ec22*), *Klebsiella pneumoniae* 342 (*Kp342*), *K. pneumoniae* MGH (*Kp-MGH*), *Enterobacter sp.* 638 (*E638*), *Yersinia pestis* bv *Microtus* (Yp). Phage partitioning proteins homologous to SopB are from *Yersinia* phage PY54 (PY54) and from *Klebsiella* phage phiK02 (K02).

Partition ATPase Activation by Partition Complex and DNA

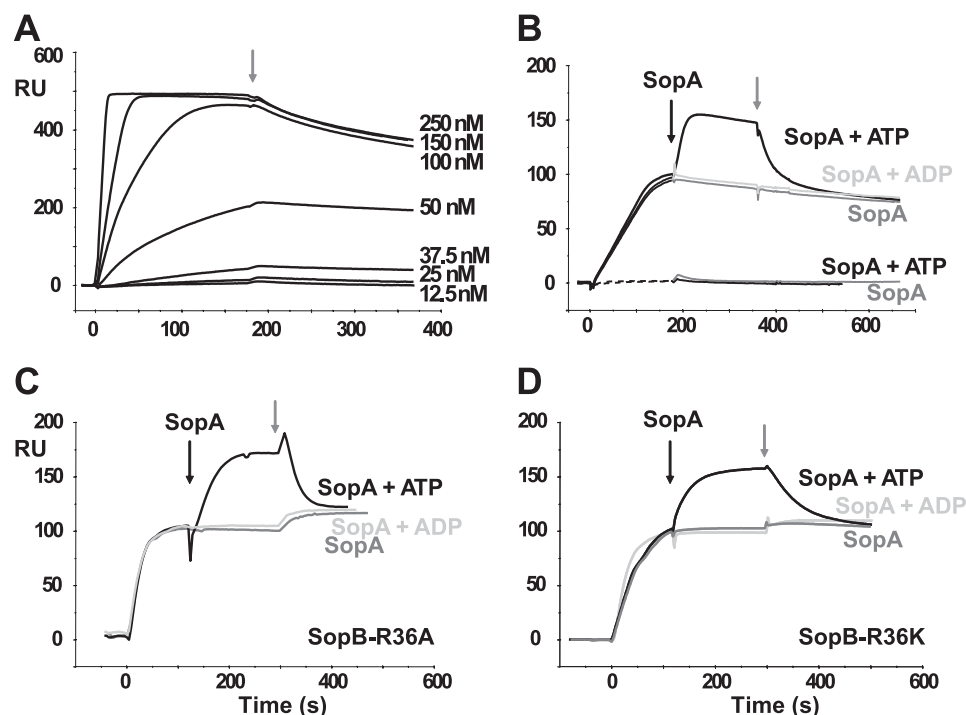


FIGURE 6. Surface plasmon resonance analysis of SopA binding to SopB immobilized on *sopC* DNA probes. Results are expressed as the difference in RU between the signals obtained with a specific (*sopC*) 136-bp probe and a nonspecific 136-bp probe, and are plotted as a function of time (seconds). **A**, SopB dose-response on *sopC* DNA. WT SopB at concentrations ranging from 12.5 to 250 nM was injected at time 0 over immobilized DNA probes. After binding, complexes were washed with the same buffer without SopB at the time indicated by the gray arrow. **B**, SopA binding to SopB/*sopC* complex. Buffer containing WT SopB at 37.5 nM (black lines) or not (black dashed lines) was passed over immobilized DNA probes at time 0. After 180 s, buffer with SopA (250 nM) in the absence (dark gray line) or presence of ATP (black line) or ADP (light gray line) was injected (black arrow). Complexes were washed with buffer without proteins at the time indicated by the gray arrow. **C–D**, as in **B** except that 250 nM SopB-R36A and SopB-R36K, respectively, were injected.

activates SopA ATPase through the action of Arg-36 as an R-finger. We next checked whether Arg-36 fulfilled the two other criteria.

Arginine 36 Is Conserved within a Small ParB Subfamily—The N-terminal domains of ParB proteins are extremely variable, both in sequence and size, which limits reliable alignment of this domain with the ParB homolog family. To evaluate conservation of the apparent R-finger, we restricted alignment to closely related SopB homologs. We found only nine homologs that have an arginine corresponding to SopB-R36 (Fig. 5). Members of this small subfamily are present on seven plasmids and two phages, which share 45–95% amino acid identity with the whole of the SopB sequence. Arg-42 is not found in all members of this subfamily. It is effectively deleted from the prophage plasmids. In two other members of the group it is replaced by lysine, which, taken with the full stimulation of SopA ATPase by SopB^{R42K}, argues for a role of this positively charged residue in activation of ATP hydrolysis.

SopB-R36 and -R42 Variants Interact with ATP-bound SopA—Because the N terminus of SopB includes the SopA recognition domain, attribution of R-finger function to Arg-36 was conditional on the ability of SopB-R36 mutant proteins to interact normally with SopA. We therefore analyzed the interaction properties of the wt and mutant SopB proteins. In EMSA, both Arg-36 mutants were as effective as wt in retarding *sopC* DNA, showing that their affinity for DNA was unaffected (supplemental Fig. S2). To test interaction of SopB with SopA, we per-

formed surface plasmon resonance (SPR) experiments, in which SopB had been loaded onto immobilized 136-bp DNA probes containing a single SopB binding site (*sopC* unit-*sCu*) as shown in Fig. 6A. These dose response data (Fig. 6A), gave a K_a (association) of $2.0 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a K_d (dissociation) of $4.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ and the resulting K_D of 2.3 nM, comparable with our previous results obtained by EMSA and filter binding experiments (6).

When SopA was injected after formation of SopB/*sopC* complexes (Fig. 6B), an increase in the SPR signal (about 50 RU) was detected, indicating interaction between SopA and SopB bound to *sCu*-containing DNA. Such interaction occurred only when ATP was present. If ATP was replaced by ADP or omitted, no interaction was detected. SopA showed no specific binding to *sCu* DNA, with or without ATP. These results show that SopA in its ATP-bound form interacts with the Sop partition complex. This behavior parallels the ATP-dependent binding of P1 ParA to ParB-*parS* seen by EMSA (11).

SopB variants deficient in SopA ATPase activation were then tested for interaction with SopA. SopB^{R36A} and SopB^{R36K} bind to *sCu*-containing DNA as avidly as wt (Fig. 6, C and D). Injection of SopA after formation of these SopB-R36/*sCu* complexes increased the SPR signal to the same degree as with wt SopB. Moreover, this interaction was ATP-dependent and did not occur with ADP or without nucleotide. Similar results were obtained with SopB^{R42A} and SopB^{R42K} variants (data not shown). These data indicate that the affinity of SopB-R36 and SopB-R42 for the ATP form of SopA was unchanged from that of wt SopB.

Basis of Supplementary ATPase Stimulation by the Partition Complex—The centromere *sopC* is required for maximal activation of SopA ATPase activity (Fig. 1A). This centromere effect, also seen with SopB-R36 and SopB-R42 variants (Fig. 4A), was confirmed by the inability of SopB^{*2}, deficient in *sopC* binding but proficient in NS DNA binding, to display it (Fig. 3). We envisage two types of explanation for the stimulatory effect of *sopC*: (i) by simultaneously binding SopA and *sopC*, SopB raises the rate at which *sopC*-flanking DNA encounters the DNA interaction surface of SopA; (ii) upon binding *sopC*, SopB undergoes a conformational change that makes it a better stimulator. The first hypothesis appears less likely since at high DNA concentration the presence of *sopC* is still necessary for maximal activation (Fig. 1B). Rather, two observations argue for the second hypothesis.

Partition ATPase Activation by Partition Complex and DNA

First, the peptide SopB-N52, with no DNA-binding domain, strongly activates SopA ATP hydrolysis (Fig. 4B). This level of activation reaches the highest stimulation observed with wt SopB in the presence of *sopC* DNA (Fig. 1C). Thus, the R-finger motif present in SopB-N52 is by itself sufficient to ensure maximal activation, provided DNA is present to contact SopA. This suggests that the conformation of full-length SopB imposes a constraint that does not allow the R-finger to efficiently reach the ATP pocket of SopA, and that upon binding to the hth, *sopC* announces its presence by transmitting a conformational signal to the Nter part of SopB.

Second, analysis of SopB¹ and SopB³ behavior revealed that they are intrinsically better activators than wt SopB, since in the absence of DNA they both stimulate SopA ATPase activity 3 times more efficiently than wt (Fig. 3), to the same level as achieved by the partition complex. Moreover, in the presence of DNA, these two mutants strongly activate ATPase activity and are insensitive to the presence of *sopC*. This is particularly evident for the triple mutant, highly impaired for NS and *sopC* DNA binding activities, which stimulates ATP hydrolysis to the maximal level reached with wt SopB in the presence of *sopC*. These two DNA binding-deficient SopB mutants have in common a mutation at position Ala-183, which corresponds to a very highly conserved alanine present in the first helix of most subfamilies of hth motifs (33). Mutations of this alanine in SopB could mimic *sopC* binding and induce a change in SopB conformation similar to that obtained upon SopB binding to *sopC*. SopB-A183 mutants would then be locked in a stimulatory conformation.

DISCUSSION

ParA proteins must interact with ATP to bring about partition. The observation that binding of Walker-box ParA proteins to nonspecific DNA, itself ATP-dependent, determines their polymerization and partition behavior has refocused attention on the long-known ability of DNA to stimulate ATP hydrolysis (12, 27, 28). Previous data had indicated only that addition of DNA or the cognate ParB protein stimulated ATP hydrolysis slightly and that addition of both (whether or not the DNA had a centromere site) induced a greater-than-additive stimulation of ATPase (24, 25). How DNA acts in this latter amplification, through an independent activation of ParA proteins which is synergistic with that of ParB, or by binding to ParB to convert it to a better stimulator, was unknown. The present study shows that in the case of the Sop system the answer is, both.

Our results effectively define three conditions in which DNA stimulates SopA to hydrolyze ATP, summarized schematically in Fig. 7. Nonspecific DNA alone interacts with the specific binding interface represented by Lys-340 (28), to induce a modest activation of ATPase (Fig. 1A). Nonspecific DNA in the presence of SopB activates SopA ATPase more strongly than either DNA or SopB alone, as seen before, but by using SopB mutants defective in DNA binding we have shown that here also DNA is acting only via its SopA binding interface, not through SopB (Fig. 3). Presumably, changes in conformation or oligomerization induced by the separate contacts DNA and SopB make with SopA mutually reinforce each other to pro-

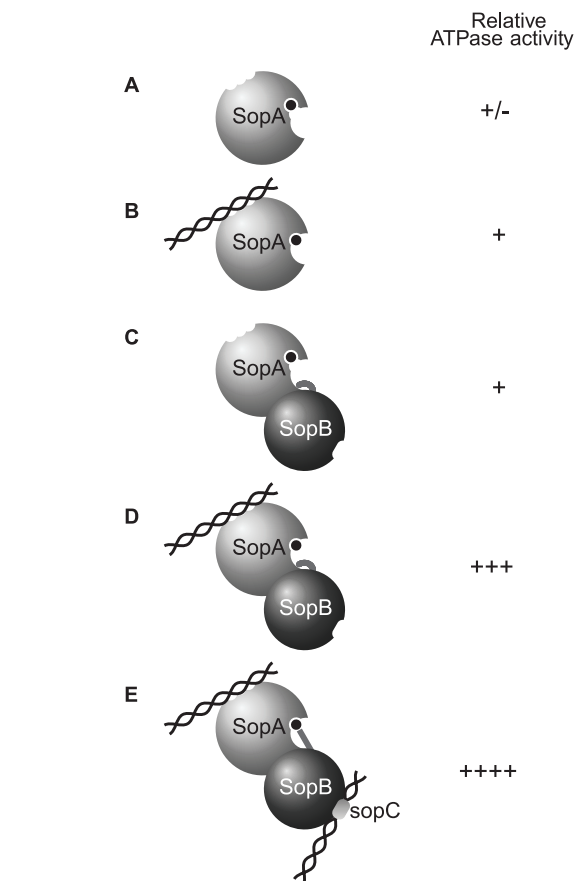


FIGURE 7. Model for SopA ATPase activation by nonspecific DNA and the partition complex. SopA ATPase (light gray sphere) binds ATP (black circle), nonspecific DNA (intertwined helices), and SopB (dark gray sphere) and these interactions stimulate ATP hydrolysis by SopA to various extents, as indicated on the right. Both SopA and SopB form dimers but are represented as unique spheres for simplicity. *A*, SopA alone exhibits very low intrinsic ATPase activity. *B*, in the presence of NS DNA, SopA ATPase activity is modestly activated (2-fold). *C*, interaction with SopB alone stimulates ATP hydrolysis about 3-fold. This activation requires the R-finger motif (curved gray extension entering the SopA catalytic pocket) in the N terminus of SopB. *D*, when both NS DNA and SopB contact SopA, ATPase activity is highly stimulated (40-fold). These two independent interactions act in synergy. SopA bound to NS DNA could adopt a slightly different conformation that renders the R-finger motif of SopB more efficient for the neutralization of the negative charges generated during phosphoryl transfer. *E*, in the presence of NS DNA and the partition complex, *i.e.* SopB bound to *sopC*-containing DNA (intertwined helices containing a light gray ovoid box), SopA ATPase activity is strongly stimulated (120-fold). As in *D*, the two independent interactions act in synergy and the 3-fold supplementary stimulation could be provided by a conformational change that would occur upon specific binding to *sopC* centromere. The R-finger motif of SopB would then adopt an optimal conformation (straight gray extension) in the SopA catalytic pocket for maximal stimulatory activity.

duce a more efficient ATPase. Finally, DNA containing the *sopC* centromere stimulates maximal ATP hydrolysis by SopA (Fig. 1); this time the additional activation is mediated by SopB (Fig. 3). SopB's need for *sopC* to enable it to realize its full stimulatory potential was not observed previously. However, we note the parallel between our data and ParR-mediated stimulation of its cognate ATPase, the actin-like ParM, which is also enhanced by its centromere (34). Our results thus show that DNA is provided in two ways to SopA, directly as nonspecific DNA and through SopB as centromeric DNA. The use of two distinct interfaces combined with the ability to sense whether SopB is part of a partition complex or not allows SopA to precisely tune its ATPase activity to its immediate environment.

Partition ATPase Activation by Partition Complex and DNA

The identification of two principal mechanisms of ATPase activation clarifies the role of ATP hydrolysis in the functioning of the Sop partition system. Activation of ATPase by DNA alone is probably not significant *in vivo*. Not only is it weak but in cells carrying the F plasmid SopA is generally accompanied by SopB. The presence of SopB determines two main states of SopA: in one, SopA finds itself close to both DNA and SopB and can hydrolyze ATP to generate an ATP-free form (no-nucleotide/ADP/ADP+P_i), in the other it is shielded from DNA by nonspecifically bound SopB and so retains its ATP. It is ATP-free SopA that binds to the *sopAB* promoter to enable autoregulation of *sopAB* transcription (12, 15, 35), and ATPase activation by SopB could account for the corepressor function of this protein that is needed for effective repression. It is the ATP form of SopA that spontaneously forms polymers as long as contact with DNA is avoided (12). The synergistic role of DNA in raising SopB-mediated stimulation of SopA ATPase to effective levels can be viewed as tuning hydrolysis to prepare for the act of partition, by assuring appropriate levels of Sop proteins without obliterating SopA proto-filaments as they wait to seize new partition complexes. In the other state, SopA is in direct contact with the partition complex, resulting in the highest level of ATPase activity. Thus, maximal ATP hydrolysis will be restricted to the region of the centromere(s) where it would be suitably located for displacing partition complexes. Although we have yet to tease out the biochemical details of the displacement mechanism, one factor likely to be important is the change in SopA conformation that ensues upon ATP hydrolysis. The conformation of SopA, like that of other partition ATPases such as P1 ParA, is controlled by adenine nucleotide binding (13, 14). Generation of ATP-free SopA would be particularly intense at the tip of SopA filaments in contact with partition complexes, and the transition to the new conformation could be the trigger for SopA release from them. By analogy to the eukaryotic tubulin involved in mitosis (36), we imagine that this conformational change in the filaments could provide the force to pull partition complexes away from the center of the cell, and thus to drive active partition.

Two other mechanistic aspects of SopB-mediated activation of SopA ATPase have been brought to light. One is the identification of the SopB motif involved in the activation. Mutations of arginine 36 drastically impair stimulation of SopA ATPase activity, despite the undiminished affinity of the mutant proteins for *sopC* and SopA (Fig. 6C). These are the defining characteristics of an arginine finger. They imply that Arg-36 enters the SopA active site to facilitate processing of the hydrolysis transition state. A functional homologue of SopB belonging to the distinct type Ib class of partition loci, ParG, has also been shown to activate its cognate ATPase, ParF, through an R-finger motif (37), making SopB the second example of such a centromere-binding protein and suggesting that *in trans* stimulation of partition ATPases by R-fingers could be widespread. There is however a distinction between the SopB and ParG R-finger mechanisms. The nearby Arg-42 of SopB is also involved in ATPase activation since mutation to Ala abolishes it. Mutation to Lys however does not (Fig. 4A). This puts SopB in the category of certain GTPase activating proteins (GAP) that carry a secondary positively charged residue which helps

orient the R-finger without contacting the active site (38). ParG does not carry such a residue.

The second aspect is the *sopC* stimulatory effect that makes SopB a stronger activator. Our data strongly suggest that a conformational change specifically occurs in SopB dimers upon centromere binding, and alanine 183 could be a critical residue of the hth motif involved in sensing *sopC*. Mutation of Ala-183 renders SopB hyperactive in SopA ATPase activation (Fig. 4A). We speculate that upon *sopC*-specific binding, a signal transmitted to the Nt domain alters SopB conformation, allowing optimal positioning of the Arg-36 R-finger in the SopA ATP pocket and its stabilization by Arg-42. Such a conformational change would allow the discrimination between SopB binding to nonspecific and centromeric DNA.

Since the early days of bacterial partition studies, it has been suggested that "host factors" are required for this process. However, extensive searches by several laboratories using genetical and biochemical approaches have failed to reveal specific host factors directly involved in partition. SopA, like other ParA proteins, is directly involved in the positioning of the Sop partition complexes inside the cell. By controlling SopA activities such as polymerization (12) and activation of ATP hydrolysis (Refs. 24, 25 and this study), nonspecific DNA appears to play a major role in the partition process. We propose that nonspecific DNA, represented by bacterial nucleoids, is the major host factor involved in partition.

Acknowledgments—We thank J. Rech and J. P. Castaing for technical assistance, O. Saurel for RMN determination of SopB-N52 concentration, and F. Cornet for helpful comments on the manuscript.

REFERENCES

1. Ebersbach, G., and Gerdes, K. (2005) *Annu. Rev. Genet.* **39**, 453–479
2. Hayakawa, Y., Murotsu, T., and Matsubara, K. (1985) *J. Bacteriol.* **163**, 349–354
3. Funnell, B. E., and Gagnier, L. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 3616–3624
4. Bouet, J. Y., Surtees, J. A., and Funnell, B. E. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 8213–8219
5. Schumacher, M. A., and Funnell, B. E. (2005) *Nature* **438**, 516–519
6. Bouet, J. Y., and Lane, D. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 165–173
7. Gerdes, K., Møller-Jensen, J., and Bugge, Jensen, R. (2000) *Mol. Microbiol.* **37**, 455–466
8. van den Ent, F., Møller-Jensen, J., Amos, L. A., Gerdes, K., and Löwe, J. (2002) *EMBO J.* **21**, 6935–6943
9. Garner, E. C., Campbell, C. S., and Mullins, R. D. (2004) *Science* **306**, 1021–1025
10. Garner, E. C., Campbell, C. S., Weibel, D. B., and Mullins, R. D. (2007) *Science* **315**, 1270–1274
11. Bouet, J. Y., and Funnell, B. E. (1999) *EMBO J.* **18**, 1415–1424
12. Bouet, J. Y., Ah-Seng, Y., Benmeradi, N., and Lane, D. (2007) *Mol. Microbiol.* **63**, 468–481
13. Davey, M. J., and Funnell, B. E. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 15286–15292
14. Libante, V., Thion, L., and Lane, D. (2001) *J. Mol. Biol.* **314**, 387–399
15. Mori, H., Mori, Y., Ichinose, C., Niki, H., Ogura, T., Kato, A., and Hiraga, S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 15535–15541
16. Friedman, S. A., and Austin, S. J. (1988) *Plasmid* **19**, 103–112
17. Barillà, D., Rosenberg, M. F., Nobbmann, U., and Hayes, F. (2005) *EMBO J.* **24**, 1453–1464
18. Ebersbach, G., Ringgaard, S., Møller-Jensen, J., Wang, Q., Sherratt, D. J., and Gerdes, K. (2006) *Mol. Microbiol.* **61**, 1428–1442
19. Pratto, F., Cicek, A., Weihofen, W. A., Lurz, R., Saenger, W., and Alonso, J. C. (2008) *Nucleic Acids Res.* **36**, 3676–3689

Partition ATPase Activation by Partition Complex and DNA

20. Marston, A. L., and Errington, J. (1999) *Mol. Cell.* **4**, 673–682
21. Ebersbach, G., and Gerdes, K. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 15078–15083
22. Lim, G. E., Derman, A. I., and Pogliano, J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 17658–17663
23. Hatano, T., Yamaichi, Y., and Niki, H. (2007) *Mol. Microbiol.* **64**, 1198–1213
24. Davis, M. A., Martin, K. A., and Austin, S. J. (1992) *Mol. Microbiol.* **6**, 1141–1147
25. Watanabe, E., Wachi, M., Yamasaki, M., and Nagai, K. (1992) *Mol. Gen. Genet.* **234**, 346–352
26. Leonard, T. A., Butler, P. J., and Löwe, J. (2005) *EMBO J.* **24**, 270–282
27. Hester, C. M., and Lutkenhaus, J. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 20326–20331
28. Castaing, J. P., Bouet, J. Y., and Lane, D. (2008) *Mol. Microbiol.* **70**, 1000–1011
29. Bouet, J. Y., Rech, J., Egloff, S., Biek, D. P., and Lane, D. (2005) *Mol. Microbiol.* **55**, 511–525
30. Bouet, J. Y., Bouvier, M., and Lane, D. (2006) *Mol. Microbiol.* **62**, 1447–1459
31. Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., and Wittinghofer, A. (1998) *Trends Biochem. Sci.* **23**, 257–262
32. Ravin, N. V., Rech, J., and Lane, D. (2003) *J. Mol. Biol.* **329**, 875–889
33. Rosinski, J. A., and Atchley, W. R. (1999) *J. Mol. Evol.* **49**, 301–309
34. Jensen, R. B., and Gerdes, K. (1997) *J. Mol. Biol.* **269**, 505–513
35. Yates, P., Lane, D., and Biek, D. P. (1999) *J. Mol. Biol.* **290**, 627–638
36. McIntosh, J. R., Grishchuk, E. L., Morphew, M. K., Efremov, A. K., Zhudenkova, K., Volkov, V. A., Cheeseman, I. M., Desai, A., Mastronarde, D. N., and Ataullakhanov, F. I. (2008) *Cell* **135**, 322–333
37. Barillà, D., Carmelo, E., and Hayes, F. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 1811–1816
38. Ahmadian, M. R., Stege, P., Scheffzek, K., and Wittinghofer, A. (1997) *Nat. Struct. Biol.* **4**, 686–689

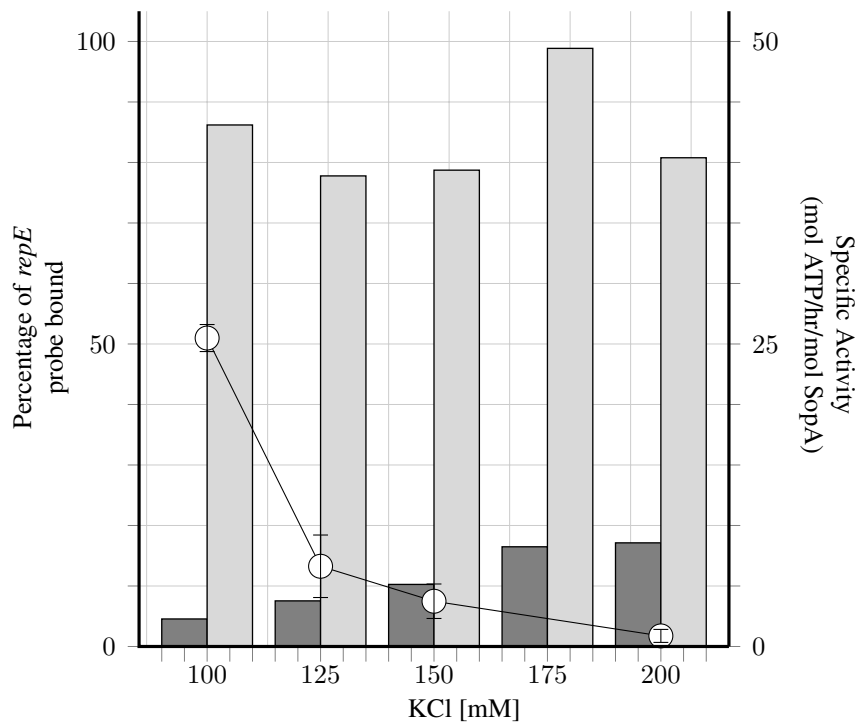


Figure S1

Figure S1: Salt dependence of the ability of SopB-N52 to bind DNA and to activate SopA ATPase. Activation of SopA ATPase by SopB-N52 peptide with DNA (light bars) or without (dark bars) was measured as in Fig. 3. Reaction mixtures contained $2 \mu\text{M}$ SopA, $20 \mu\text{M}$ SopB-N52 and $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ NS DNA with various concentrations of KCl. The 100, 150 and 200 mM KCl values are the average of 2 independent estimates. Non-specific DNA binding of SopB-N52 peptide (white circles) was assayed in triplicate by the double filter method, essentially as described in Bouet *et al.* (2007). Reaction mixtures ($20 \mu\text{l}$), assembled in the EMSA buffer without BSA, contain $20 \mu\text{M}$ SopB-N52 and 2 nM of NS DNA probes. After loading, reaction mixtures were washed twice with $120 \mu\text{l}$ of buffer.

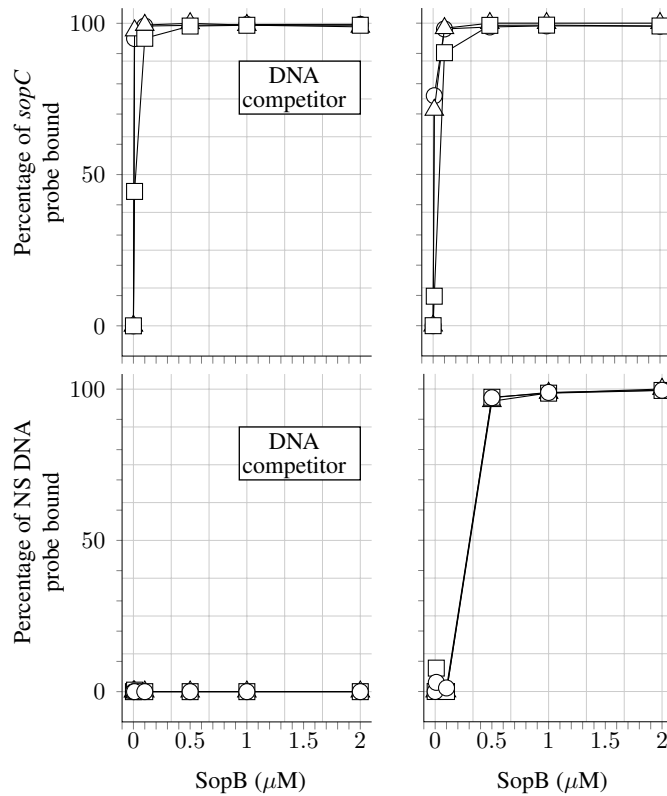


Figure S2

Figure S2: **DNA binding properties of wild type SopB and R36 mutants.** ^{32}P -labelled *sopC*-containing DNA (top panel) and NS DNA (bottom panel) fragments were incubated with increasing concentrations of wild type SopB (triangle), SopB-R36A (square) or SopB-R36K (circle) in the presence (left panel) or absence (right panel) of competitor DNA. The mixtures were subjected to electrophoresis mobility shift assay in TGE buffer as in figure 2A, and binding was quantitated as in figure 2B.

Table S3: Plasmids used in this study.

Plasmids	Relevant characteristics	Source/reference
pTYB1	pTYB1, bla, <i>p_{T7}::Sce Intein::CBD</i>	New England Biolabs
pJYB57	pBSKS ⁺ , bla, <i>sopC</i> ⁺	This work
pYAS1	pTYB1, <i>p_{T7}::sopB::Sce Intein::CBD</i>	This work
pYAS6	pYAS1, <i>p_{T7}::sopB G324::Sce Intein::CBD</i>	This work
pYAS8	pYAS6, <i>p_{T7}::sopB A183P-G324::Sce Intein::CBD</i>	This work
pYAS10	pYAS6, <i>p_{T7}::sopB K191A-R195A-G324::Sce Intein::CBD</i>	This work
pYAS12	pYAS6, <i>p_{T7}::sopB R42A-G324::Sce Intein::CBD</i>	This work
pYAS14	pYAS6, <i>p_{T7}::sopB R42K-G324::Sce Intein::CBD</i>	This work
pYAS17	pYAS10, <i>p_{T7}::sopB A183D-K191A-R195A-G324::Sce Intein::CBD</i>	This work
pYAS40	pYAS6, <i>p_{T7}::sopB R36A-G324::Sce Intein::CBD</i>	This work
pYAS41	pYAS6, <i>p_{T7}::sopB R36K-G324::Sce Intein::CBD</i>	This work
pYAS48	pTYB1, <i>p_{T7}::sopB-N52::Sce Intein::CBD</i>	This work

pYAS1 is a pTYBI derivative (*NEBioLabs*) in which, the *sopB-G324* gene, PCR amplified from pDAG170 (Bouet *et al.*, 2007), was inserted using *NdeI* and *SapI* restriction sites. pJYB57 was produced by inserting the *sopC* sequence, amplified by PCR from pDAG114 (Lemonnier *et al.*, 2000), into pBSKS(+) using *EcoRV* and *EcoRI* restriction sites.

2.B Discussion supplémentaire

Cette étude nous a permis de définir les interactions nécessaires pour la stimulation de l'activité ATPase de SopA. Pour hydrolyser l'ATP, SopA doit d'une part interagir avec l'ADN grâce à son activité de fixation non spécifique et d'autre part avec SopB. De plus, nous avons montré que la stimulation de l'hydrolyse de l'ATP est optimale lorsque SopB est liée à *sopC*. Ces données suggèrent qu'il existe trois états qui permettent la stimulation de SopA (Figure 39). L'état 1 est illustré par la stimulation de SopA par l'ADN. Le mutant SopB-K191A-R195A qui ne reconnaît plus *sopC* mais fixe toujours l'ADN non spécifique illustre l'état 2. Et l'état 3 est illustré par SopB qui en présence d'un ADN contenant *sopC*, stimule trois fois plus SopA qu'en absence de *sopC*. Nous avons vu que la partition est une réaction de positionnement des plasmides au cours du temps dans l'espace d'une cellule. Comment replacer ces trois états *in vivo* selon ces critères espace temps ?

In vivo, SopB colocalise avec le plasmide F au centre des petites cellules ou aux positions $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ des grandes cellules sur le point de se diviser (Adachi et al., 2006; Hatano et al., 2007). Dans certaines cellules de taille intermédiaire, la colocalisation peut être retrouvée à ces trois positions. Ceci suggère que dans les petites cellules, les plasmides sont en cours de répllication au centre de la cellule, et après la répllication, lorsque les substrats de partition sont prêts, les plasmides sont séparés et positionnés au futur centre des cellules filles. Dans les premières étapes de la partition, SopB, qui est localisée au niveau du plasmide F, s'assemble sur *sopC* et sur l'ADN au voisinage pour former un complexe de partition étendue. Ceci suggère qu'à ce moment, les états 2 et 3 de la stimulation de l'activité ATPase de SopA ne peuvent exister qu'au niveau du complexe de partition étendu et que l'état 1 existe en dehors de la zone où se trouve le complexe de partition. Vu que l'hydrolyse de l'ATP ne semble pas nécessaire pour la polymérisation de SopA mais pourrait être impliquée dans la dépolymérisation (cf Introduction Chapitre 3.B.4.c), la fonction des états 2 et 3 à ce moment pourrait être d'inhiber la polymérisation pour éviter la séparation précoce des plasmides. *In vitro*, en présence d'ATP, SopA reconnaît non-spécifiquement l'ADN, et l'ADN inhibe la formation des polymères et stimule légèrement l'activité ATPase de SopA (état 1). *In vivo*, SopA oscille sur le nucléoïde. Bien que nous n'ayons aucune évidence, la fonction de l'état 1 pourrait permettre l'oscillation de SopA sur l'ADN de la cellule en dehors de la zone où se trouve le complexe de partition et aussi inhiber la formation des polymères par l'hydrolyse de l'ATP.

Lorsque le complexe de partition est formé et que tout l'ADN voisinant est masqué par SopB, les plasmides sont prêts pour être séparés. A ce moment au niveau du complexe de partition, la stimulation de l'activité ATPase doit être inhibée car

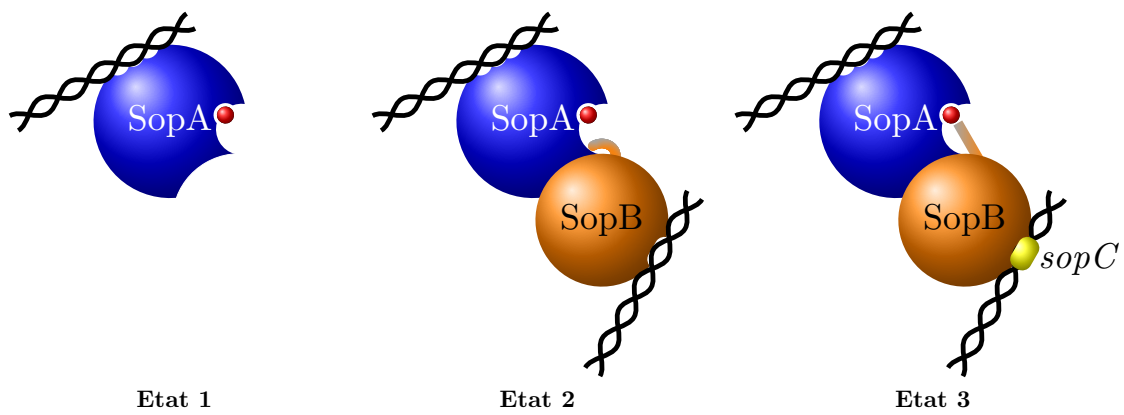


Figure 39 – **Modèle pour l'activation de l'activité ATPase de SopA**
Représentation schématique de SopA (rond bleu), liée à l'ATP (rond rouge), qui interagit avec SopB (rond orange) et l'ADN (trait noir). Pour l'état 3, SopB est fixée à une molécule d'ADN contenant *sopC* (ovale jaune).

SopA ne perçoit pas l'ADN. Ainsi la double inhibition de la polymérisation par l'ADN et par la stimulation de l'hydrolyse de l'ATP est levée, ce qui permettrait la polymérisation rapide de SopA initiant la séparation des plasmides. La séparation des plasmides va diluer la concentration locale de SopB ce qui implique l'apparition de nouveaux contacts possibles avec l'ADN. A ce moment, le contact avec l'ADN et l'état 2 de la stimulation de l'activité ATPase pourrait initier la dépolymérisation de SopA. La stimulation de l'activité ATPase pourraient avoir deux fonctions *in vivo* : (i) l'inhibition de la polymérisation de SopA et (ii) l'initiation de la dépolymérisation. Bien que dans les deux cas les résultats aboutissent à l'inhibition de la polymérisation, ces deux fonctions peuvent être découplées car ils interviennent à deux étapes distinctes de la partition. Une troisième fonction pourrait être attribuée à ce mécanisme. En effet, SopA-ADP et SopA libre sont capables de fixer le promoteur *pSop in vitro* (Bouet et al., 2007). *In vivo* l'hydrolyse de l'ATP pourrait fournir une quantité supplémentaire de ces deux formes de SopA, susceptibles d'autoréguler l'opéron *sopAB*.

Naturellement, ceci est un modèle d'étude basé sur des données expérimentales et des hypothèses, et doit être considéré comme tel. Cependant, afin d'améliorer ce modèle, je me suis intéressé à l'étude du rôle de la stimulation de l'activité ATPase de SopA *in vivo*. Cette étude est présentée dans le chapitre suivant.

Chapitre 3

Le rôle de la stimulation de l'activité ATPase de SopA *in vivo*

Plusieurs études sur l'importance de l'activité ATPase des ParA de type I *in vivo* ont été réalisées jusqu'à présent. Dans notre équipe, il a été montré que deux mutations de SopA (SopA-K120R, SopA-K120Q) concernant le résidu lysine 120 du motif Walker A impliqué dans la fixation de l'ATP, induisent une perte de l'activité ATPase et une incapacité de partition (Libante et al., 2001). Pour ParA de P1, plusieurs mutations de résidus conservés des motifs A', Walker A et Walker B ont été réalisées (Davis et al., 1996; Fung et al., 2001) et ces mutants sont tous déficients pour l'activité ATPase et pour la partition. Ces études indiquent qu'il existe une corrélation entre l'activité ATPase et la partition. Cependant, il n'est pas exclu que ces mutants de ParA soient bloqués dans une conformation particulière *in vivo* à cause des mutations au niveau du site catalytique des ParA. Les protéines ne pourraient donc pas changer de conformation entre les différents états de liaison au nucléotide. Par exemple, suivant le remplacement du résidu K120 de SopA par une arginine ou une glutamine, on obtient ou pas un super répresseur donc une protéine qui pourrait être bloquée dans la forme libre ou la forme SopA-ADP. Dans ce cas, la déficience observée pour la partition pourrait être causée par la conformation bloquée des protéines et non pas par la perte de l'activité ATPase.

Dans notre étude présentée ci-dessus, nous avons pu mettre en évidence deux résidus de SopB impliqués dans la stimulation de l'activité ATPase de SopA (Ah-Seng et al., 2009). Ces mutations concernent le résidu arginine 36 qui est le motif arginine « finger » et le résidu arginine 42. Nous avons muté l'arginine de ces deux positions en alanine (*sopB^{R36A}*, *sopB^{R42A}*) et en lysine (*sopB^{R36K}*, *sopB^{R42K}*) et nous avons observé qu'à l'exception de la protéine SopB-R42K, les protéines SopB-R36A, SopB-R36K et SopB-R42A sont déficientes pour la stimulation de l'activité ATPase de SopA, avec un effet plus marqué pour la mutation R36A. De manière

Piste	1	2	3	4	5
SopA					
Quantification	1	2,1	1,8	1	0,8
SopB					
Quantification	1	3,3	2	1	1,1

Figure 40 – **Quantification de SopA et de SopB sous le contrôle du promoteur *pSop***

Les pistes 1 à 5 représentent les extraits bruts de SopA et de SopB prélevés dans les souches contenant les plasmides mini-F *sopABC* portant respectivement les gènes *sopB* (piste 1) ou les mutations R36A (piste 2), R36K (piste 3), R42A (piste 4), R42K (piste 5) et révélés par Western blot. Les bactéries ont été cultivées dans le milieu de culture LB. La quantification est le rapport de chaque piste sur la piste 1.

Plasmide	Caractéristique	% miniF perdu par génération	Nb	Promoteur
pDAG115	<i>sopB/ΔsopC</i>	5,01 +/- 2,25	6	<i>pSop</i>
pDAG114	<i>sopB</i>	0,08 +/- 0,06	4	<i>pSop</i>
pYAS44	<i>sopB^{R36K}</i>	0,29	1	<i>pSop</i>
pYAS26	<i>sopB^{R42A}</i>	0,03 +/- 0,03	3	<i>pSop</i>
pYAS36	<i>sopB^{R42K}</i>	0,05 +/- 0,02	2	<i>pSop</i>
pDAG173	<i>sopB</i>	0,1 +/- 0,08	6	<i>pLtetO</i>
pYAS43	<i>sopB^{R36A}</i>	0,27 +/- 0,17	3	<i>pLtetO</i>
pYAS45	<i>sopB^{R36K}</i>	0,25 +/- 0,22	3	<i>pLtetO</i>
pYAS29	<i>sopB^{R42A}</i>	0,07 +/- 0,07	2	<i>pLtetO</i>
pYAS37	<i>sopB^{R42K}</i>	0,12 +/- 0,1	3	<i>pLtetO</i>

Tableau 2 – **Test de stabilité des plasmides mini-F portant un locus *sopABC***

Les tests de stabilité sont réalisés dans la souches DH10B dans le milieu MS1. Le nombre de génération total atteint à la fin de l'expérience est d'environ 23. La caractéristique du gène *sopB* porté par le plasmide est indiquée dans la colonne de droite. Le nombre de répétition de l'expérience est indiqué dans la colonne Nb, et le promoteur de l'opéron *sopAB* est indiqué dans la colonne promoteur.

intéressante, SopB-R42K stimule SopA à des taux comparables à ceux de SopB. Pour la première fois pour le système de partition de type Ia, nous pouvons étudier les conséquences de la perte *in vivo* de l'activation de l'hydrolyse de l'ATP en présence d'une ATPase sauvage. Nous nous sommes donc intéressés au rôle de la stimulation de l'activité ATPase *in vivo*. Cette étude, présentée dans ce chapitre, nous a permis de montrer qu'*in vivo* cette stimulation est essentielle pour la partition, mais aussi pour la régulation de l'opéron *sopAB*.

3.A Le rôle de la stimulation de l'activité ATPase dans la partition

Pour étudier l'implication de la perte de la stimulation de l'activité ATPase *in vivo*, nous avons introduit les mutations *sopB*^{R36K}, *sopB*^{R42A} et *sopB*^{R42K} dans un gène *sopB* porté par un plasmide mini-F qui possède le locus *sopABC*⁺ sous le contrôle du promoteur *pSop* (pDAG114). Nous avons ensuite mesuré la stabilité du plasmide mini-F au cours des générations. Les tests de stabilité sont réalisés dans la souche DH10B dans un milieu pauvre (MS1) afin de réduire le nombre de copies des plasmides dans les cellules. Les résultats nous indiquent que le pourcentage de perte aléatoire d'un plasmide ne portant pas *sopC* (pDAG115) est d'environ 60 fois supérieure à celui du pDAG114, alors que les pourcentages de perte des plasmides portant la mutation *sopB*^{R36K} (pYAS44), *sopB*^{R42A} (pYAS26) ou *sopB*^{R42K} (pYAS36) ne sont pas significativement différents de celui du pDAG114 (tableau 2). Ceci est compréhensible pour la mutation R42K qui a une activité sauvage concernant la stimulation de SopA *in vitro*, mais surprenant pour les mutations R36K et R42A qui sont déficientes pour l'activation de SopA *in vitro*. Dans ces conditions, l'absence de stimulation de l'hydrolyse de l'ATP par SopB n'a pas d'effet significatif sur la partition.

Une hypothèse pour expliquer cette observation est que la perte de la stimulation de l'activité ATPase de SopA pourrait influencer la régulation de l'opéron *sopAB* et donc modifier la concentration des protéines *in vivo*. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences de Western blot pour quantifier la concentration des protéines SopA et SopB produites pour chaque mutation (Figure 40). L'expérience est réalisée dans un milieu LB. La quantification indique que la concentration des protéines SopA et SopB est plus importante dans une souche portant un plasmide avec les mutations R36 et parmi ces mutations, celle qui induit une production plus forte des protéines est la mutation R36A. Les mutations R42 n'influencent pas la concentration des protéines. Il semblerait que la perte de la stimulation de l'activité ATPase ait une implication sur la régulation de l'opéron

Piste	1	2	3	4
SopA				
Quantification	1	1,4	1,4	1,6
SopB				
Quantification	1	1,5	1,7	1,8

Figure 41 – **Quantification de SopA et de SopB sous le contrôle du promoteur *pSop* ou *pLtetO***

Les pistes 1 à 4 représentent les extraits bruts de SopA et de SopB prélevés à partir des souches contenant les plasmides mini-F avec le locus *sopABC* sous le contrôle du promoteur *pSop* (1,2) ou *pLtetO* (3,4) et révélés par Western blot. Les plasmides portent les gènes *sopB* (1,3) ou *sopB^{R36A}* (2,4). Les bactéries ont été cultivées dans le milieu de culture MS2. La quantification est le rapport de chaque piste sur la piste 1.

Plasmide	Caractéristique	Incompatibilité	% miniF perdu par génération	Promoteur
pDAG173	<i>sopB</i>	pZC20	0,33 +/- 0,07	<i>pLtetO</i>
pDAG115	<i>sopB/ΔsopC</i>	pZC314	1,53 +/- 0,43	<i>pSop</i>
pDAG114	<i>sopB</i>	pZC314	0,26 +/- 0,04	<i>pSop</i>
pDAG173	<i>sopB</i>	pZC314	7,43 +/- 1,72	<i>pLtetO</i>
pYAS43	<i>sopB^{R36A}</i>	pZC314	2,71 +/- 1,18	<i>pLtetO</i>
pYAS29	<i>sopB^{R42A}</i>	pZC314	2,13 +/- 0,3	<i>pLtetO</i>
pYAS37	<i>sopB^{R42K}</i>	pZC314	5,5 +/- 0,12	<i>pLtetO</i>

Tableau 3 – **Test d'incompatibilité des plasmides mini-F portant un locus *sopABC* avec un plasmide portant *sopC***

Les tests d'incompatibilité sont réalisés dans la souches MG1655 dans le milieu LB. Le nombre de génération totale atteinte à la fin de l'expérience est d'environ 23. La caractéristique du gène *sopB* porté par le plasmide est indiquée dans la colonne de droite. Le promoteur de l'opéron *sopAB* est indiqué dans la colonne promoteur. Toutes les activités sont normalisées au 100% qui correspond à l'activité mesurée dans la souche sans protéines *sop*. Les écarts types sont calculés sur une moyenne de trois répétitions pour chaque expérience.

sopAB. Cette implication n'est pas observée pour la mutation R42A.

Afin de pouvoir répondre clairement à la question de l'effet de la stimulation de l'hydrolyse de l'ATP par SopB et nous affranchir de la différence de niveau d'expression due à l'auto-régulation, nous nous sommes placés dans un système où l'opéron *sopAB* est sous le contrôle du promoteur *pLtetO* (Lutz and Bujard, 1997). Dans nos conditions d'expérimentation le promoteur n'est pas induit, car la fuite du promoteur suffit pour produire les protéines SopA et SopB à des concentrations qui permettent la stabilisation des plasmides. La quantification par Western blot de ces protéines extraites de cellules en croissance dans un milieu pauvre (MS2) (Figure 41), montre que sous le contrôle du promoteur *pLtetO*, la quantité des protéines produites dans un contexte *sopB* (pDAG173) (piste 3) ou *sopB^{R36A}* (pYAS43) (piste 4) est équivalente. La quantité de protéines produites sous le contrôle du promoteur *pLtetO* (piste 3,4) est plus importante (augmentation de 40 à 60% pour SopA et de 70 à 80% pour SopB) que celle produite sous le contrôle du promoteur *pSop* (piste 1). Ici nous pouvons noter que dans un contexte *sopB^{R36A}* (piste 2), la dérégulation du promoteur *pSop* conduit à la production d'une quantité de protéine équivalente au système contrôlé par le promoteur *pLtetO*, soit 40% de plus pour SopA et 70% de plus pour SopB (comparé piste 2 à piste 3 et 4). Une différence est observée entre la figure 40 et la figure 41 pour la quantification des échantillons des souches contenant le plasmide portant la mutation *sopB^{R36A}* (pYAS42) (comparer quantification piste 2 de la figure 40 et piste 2 de la figure 41). Cette différence est principalement due à la différence de milieux de culture utilisés pour les deux quantifications (milieu riche pour la première et milieu pauvre pour la deuxième).

Nous avons donc mesuré la stabilité du plasmide mini-F dans le système où la production de SopA et de SopB est contrôlée par le promoteur *pLtetO* (tableau 2). Le plasmide témoin de la perte aléatoire est pDAG115, utilisé dans l'expérience de stabilité précédente. Il est perdu à 5% par cellule et par génération, alors que le plasmide de référence, pDAG173, est stable (0,1% de perte par cellule et par génération). Le taux de perte des plasmides portant les mutations *sopB^{R36A}* (pYAS43) et *sopB^{R36K}* (pYAS44) est environ 2,5 fois plus important que celui du pDAG173, alors que le taux de perte des plasmides portant les mutations *sopB^{R42A}* (pYAS29) et *sopB^{R42K}* (pYAS37) est équivalent au pDAG173. Bien qu'une différence est observée ici, elle reste minime, et les écarts types ne nous permettent pas d'affirmer que cette différence est significative. Pour conclure sur ces deux tests de stabilité, il semblerait que soit la perte de la stimulation de l'activité ATPase n'a pas d'impact sur la partition, ou soit les systèmes que nous avons utilisé ne nous permettent pas de détecter cet impact.

Au vu des résultats obtenus, il est possible que la perte de la stimulation de

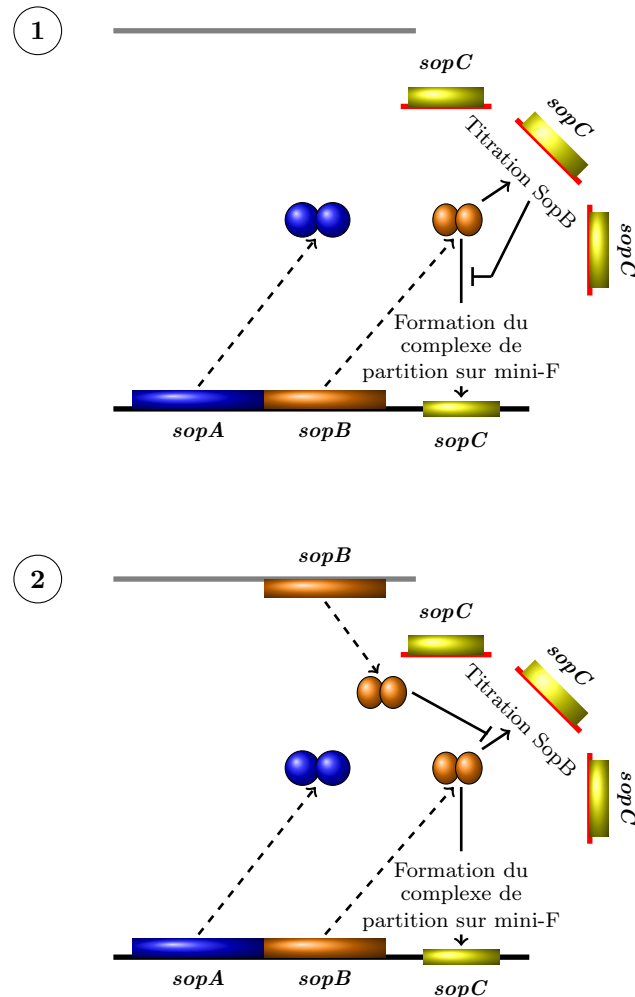
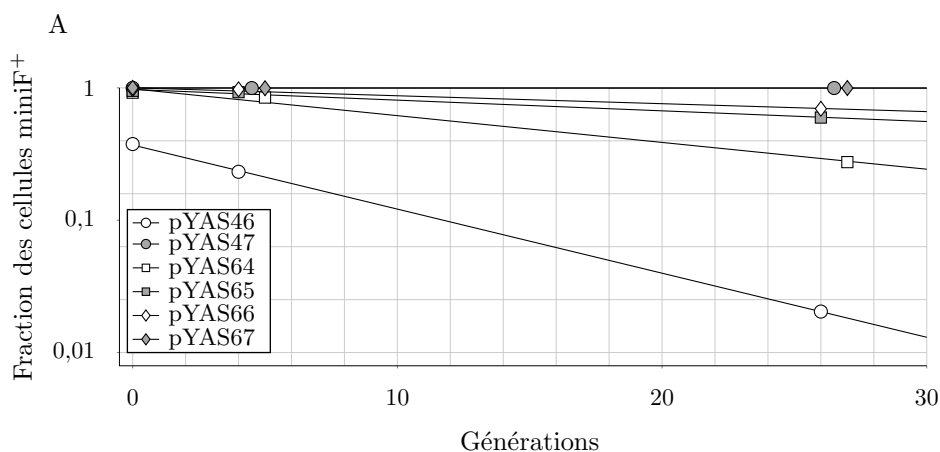


Figure 42 – Représentation schématique de la titration de SopB dans un contexte d'incompatibilité

1-2) Le plasmide mini F (trait noir) possède les gènes *sopA* (rectangle bleu) et *sopB* (rectangle orange) en *cis* avec *sopC* (rectangle jaune). Les protéines SopA (cercle bleu) et SopB (ovale orange) sont transcrites et traduites (flèches pointillées). Les plasmides à haut nombre de copies (trait rouge) portant *sopC*, titre SopB. En 2) la production en *trans* de SopB sur le chromosome (trait gris) compense la titration.

l'activité ATPase n'ait qu'un effet mineur sur la partition. Cependant, si cet effet est réel, il devrait être amplifié dans un système où une contrainte existe pour le système de partition. Dans une cellule qui possède deux plasmides différents portant le même système de partition, il se produit un phénomène d'incompatibilité entre les plasmides (pour revue Bouet et al. 2007). Dans ce contexte, un plasmide mini-F est perdu à un taux plus élevé s'il se trouve en présence d'un plasmide à haut nombre de copies portant le site *sopC* (Bouet et al., 2005; Gardner et al., 1982; Kline, 1979). Pour expliquer ce phénomène, les auteurs ont suggéré que les multiples sites de *sopC* agissent en titrant les protéines SopB et en empêchant la formation du complexe de partition sur le plasmide F, car si on apporte plus de SopB en *trans*, on diminue l'incompatibilité (Figure 42). Nous nous sommes donc placés dans ce système afin de voir si la perte de la stimulation de l'activité ATPase a un impact sur l'incompatibilité. Pour cela, nous avons transformé une souche MG1655 contenant le plasmide pZC314, un dérivé du plasmide pSC101 possédant le site *sopC* avec les différents plasmides mini-F. La souche témoin négatif possède le plasmide pZC20, un dérivé du plasmide pSC101 sans le site *sopC* et le pDAG173. Nous avons ensuite mesuré la stabilité des plasmides mini-F au cours des générations dans ce contexte (tableau 3). Le taux de perte ici ne sera pas comparé au taux de perte observé pour les tests de stabilité précédents car les expériences sont réalisées dans des souches et dans des milieux de culture différents. Ici, l'expérience d'incompatibilité est effectuée dans un milieu de culture riche (LB). En présence de pZC20, pDAG173 est stable avec un taux de perte relativement bas. Dans cette souche, le taux de perte aléatoire du pDAG115 est d'environ de 1,5% par cellule et par génération. En présence du pZC314, le taux de perte du pDAG114 est faible, alors que le taux de perte du pDAG173 est important et plus élevé que le taux de perte aléatoire. Ces données indiquent que dans ce contexte, un excès d'un facteur de 1,5 à 2 fois plus pour SopA et d'un facteur de 2 à 3 fois plus pour SopB, augmente l'incompatibilité entre les plasmides. Ceci a aussi été observé par Bouet et collaborateurs (Bouet et al., 2005). Le taux de perte des plasmides pYAS43 et pYAS29 sont comparables et sont 2,7 à 3,5 fois plus faibles que celui du pDAG173. Il semblerait donc que la perte de la stimulation de l'activité ATPase ait une influence sur l'incompatibilité des plasmides et donc sur le système de partition. Cette observation est confirmée par le taux de perte du pYAS37 qui est aussi élevé, et comparable à celui du pDAG173. Ici nous mettons en évidence qu'une fonction assurée normalement par SopB n'est plus assurée par les mutants SopB-R36A et SopB-R42A. La conséquence de cette perte de fonction est la diminution du taux de perte des plasmides mini-F et donc la diminution de l'incompatibilité entre le mini-F et le pZC314.

Dans notre expérience, le gène *sopB* est localisé en *cis* sur le plasmide F et en



B

Plasmide	Caractéristique	% miniF perdu par génération
pYAS46	<i>sopA</i>	10,4 +/- 0,7
pYAS47	<i>sopAB</i>	0,005 +/- 0,003
pYAS64	<i>sopAB^{R36A}</i>	5 +/- 0,4
pYAS65	<i>sopAB^{R36K}</i>	1,8 +/- 0,2
pYAS66	<i>sopAB^{R42A}</i>	1,2 +/- 0,3
pYAS67	<i>sopAB^{R42K}</i>	0,004 +/- 0,002

Figure 43 – **Test de stabilité des plasmides mini-F en *trans***

Les tests de stabilité sont réalisés dans la souche MC1061 dans le milieu MS2. Le nombre de génération totale atteinte à la fin de l'expérience est d'environ 28. A) Représentation graphique des fractions de cellules portant le plasmide mini-F au cours des générations. La légende est indiquée sur le graphique. B) Taux de perte des plasmides mini-F. Les plasmides ainsi que la caractéristique de l'opéron *sopAB* porté par le plasmide sont indiqués dans le tableau. Les écarts types sont calculés sur une moyenne de trois répétitions pour chaque expérience.

amont du site *sopC*. Dans des conditions ordinaires, la production locale de SopB permettrait à la majorité des protéines de fixer directement le site *sopC* et de s'étendre sur l'ADN voisinant une fois que le site est saturé. Dans un contexte d'incompatibilité, les plasmides pZC314 portant les sites *sopC* vont titrer les protéines SopB et donc empêcher la formation du complexe de partition ce qui conduit à une augmentation du taux de perte des plasmides mini-F. Bouet et collaborateur (Bouet et al., 2005) ont utilisé un plasmide mini-F portant l'opéron *SopAB* sous le contrôle du promoteur *pSop*. Dans ce système, le plasmide mini-F est aussi déstabilisé en présence d'un plasmide à haut nombre de copies, et une quantité supplémentaire de SopB en *trans*, diminue l'incompatibilité. Cependant, si on augmente également la quantité de SopB et de SopA en *trans*, l'incompatibilité est à nouveau observée, et le pourcentage de perte des plasmides mini-F est supérieure au pourcentage de perte observé dans des conditions normales de production des protéines SopA et SopB. Dans notre étude, l'opéron *sopAB* du pDAG173 n'est plus régulé et la production de SopA et de SopB est supérieure aux taux de production mesurés dans les conditions où l'opéron est régulé. Dans ce cas, l'incompatibilité observée est aussi importante que lorsque l'on surproduit SopA et SopB en *trans*. Ces données suggèrent qu'il pourrait exister un effet *trans* sur la stabilité des plasmides mini-F dans un contexte d'incompatibilité et cet effet est atténué avec la perte de la stimulation de l'activité ATPase. Nous avons donc testé la partition directement dans un système en *trans*, qui pourrait révéler plus clairement l'importance de la stimulation de l'activité ATPase de SopA. Nous avons construit un vecteur qui nous permet de produire les protéines SopA et SopB en *trans* sous contrôle du promoteur inductible *pLac* et nous avons regardé si ce vecteur de production était capable de stabiliser un plasmide mini-F Δ *sopAB* portant le site *sopC* (pDAG209). Le test de stabilité est réalisé dans la souche MC1061 dans un milieu pauvre (MS2). Dans ce système, la production des protéines est environ 2,5 fois plus importante que le système de production sous le contrôle du promoteur *pLtetO*. Pour le témoin de perte aléatoire, nous avons construit un plasmide ne produisant que SopA (pYAS46). En présence de SopA seule, le pDAG209 n'est pas stabilisé, et est perdu aléatoirement à un taux d'environ 10% par cellule et par génération (Figure 43). En présence de SopA et de SopB, le pDAG209 est stabilisé à un taux de 0,005% par cellule et par génération. Les pourcentages de perte du pDAG209 en présence des plasmides portant les mutations R36A (pYAS64), R36K (pYAS65), R42A (pYAS66) et R42K (pYAS67) sont respectivement de 5% 1,8% 1,2% 0,004% par cellule et par génération. En présence du pYAS64, pYAS65 ou pYAS66 le taux de perte du plasmide pDAG209 est respectivement d'un facteur 1000, 360 et 240 fois plus important que le taux de perte observé en présence du pYAS47 ou du pYAS67. Le mutant R36A, le plus déficient

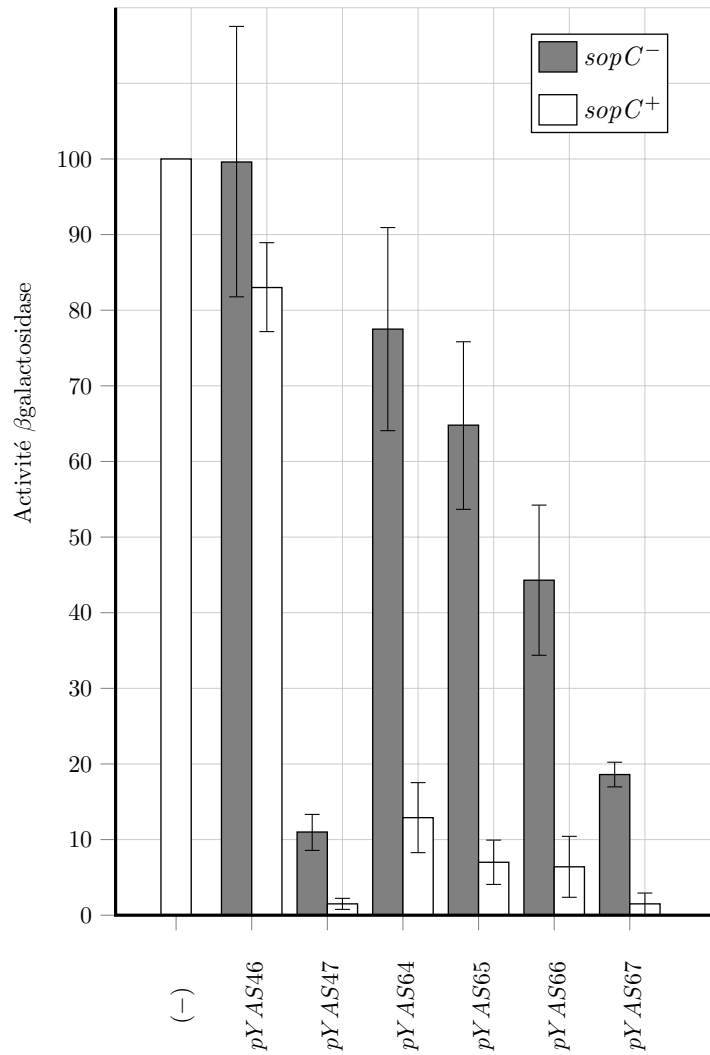


Figure 44 – **Répression de la transcription en *trans***

Les tests de répression sont réalisés dans la souche MC1061 dans le milieu LB en absence (barres blanc) ou en présence (barres gris) de *sopC*. Les protéines SopA et ou SopB sont soit absente (-) ou soit apportées en *trans* par le plasmide indiqué sur l'axe des abscisses. Les écarts types sont calculés sur une moyenne d'au moins trois répétitions pour chaque expérience.

dans la stimulation de l'activité ATPase, induit un défaut de partition plus marqué, alors que les mutants R36K et R42A qui ont une déficience intermédiaire dans la stimulation de l'activité ATPase induisent un défaut de partition qui est aussi intermédiaire. Le mutant R42K qui est sauvage pour la stimulation de SopA stabilise complètement le pDAG209.

Ce test de stabilité du plasmide mini-F par la production des protéines SopA et SopB en *trans*, nous permet de montrer que la stimulation de l'activité ATPase est essentielle pour la partition. Le profil observé pour la stimulation de l'hydrolyse de l'ATP *in vitro* est en concordance avec le profil observé pour le test de stabilité en *trans in vivo*. Cependant l'étape à laquelle la stimulation de l'hydrolyse de l'ATP est requise pour assurer la partition reste à définir.

Il semblerait que la stimulation de l'activité ATPase de SopA serait aussi impliquée dans la régulation de l'opéron *sopAB*. En effet, nos expériences de Western blot indiquent qu'un mutant déficient pour l'activation de l'hydrolyse de l'ATP est aussi déficient pour la régulation de l'opéron *sopAB*. Dans la partie suivante, je présente l'étude que nous avons réalisée sur ce mécanisme.

3.B Le rôle de la stimulation de l'activité ATPase dans la régulation de l'opéron *sopAB*

Pour étudier l'implication de la stimulation de l'activité ATPase sur la régulation de l'opéron *sopAB*, nous avons introduit le gène *sopA* et/ou le gène *sopB* (sauvage ou mutant R36/R42) par l'intermédiaire des plasmides présentés ci-dessus (pAYS46/47/64/65/66/67) dans une souche portant sur son chromosome la fusion *sopOP* : *lacZ*. Sur ces vecteurs, les gènes *sop* sont transcrits constitutivement à partir du promoteur *pLac*. Nous avons ensuite mesuré la capacité de répression du promoteur *pSop* en dosant l'activité β -galactosidase. Dans nos conditions et en absence de *sopC*, SopA seule n'a pas d'activité de répression (Figure 44). Cette activité est stimulée d'un facteur 9 par SopB, alors que les mutants R36A, R36K et R42A ont perdu ce facteur de stimulation. En effet, ils ne stimulent la répression que d'un facteur 1,3 1,5 et 2,2 respectivement. La stimulation par le mutant R42K est plus élevée (facteur 5,4). En présence de *sopC*, SopA a une activité de répression sensiblement plus importante. Cette activité est fortement stimulée, d'un facteur d'environ 55, par SopB et SopB-R42K. Les mutants R36A, R36K et R42A ont gardé cette stimulation supplémentaire du à la présence de *sopC*, mais ont une efficacité plus faible comparée à SopB. Leur facteur respectif de stimulation est seulement d'environ 6 12 et 13. Cette expérience nous indique clairement que l'activation de l'hydrolyse de l'ATP a un rôle important dans la régulation de l'opéron *sopAB*. Le profil observé

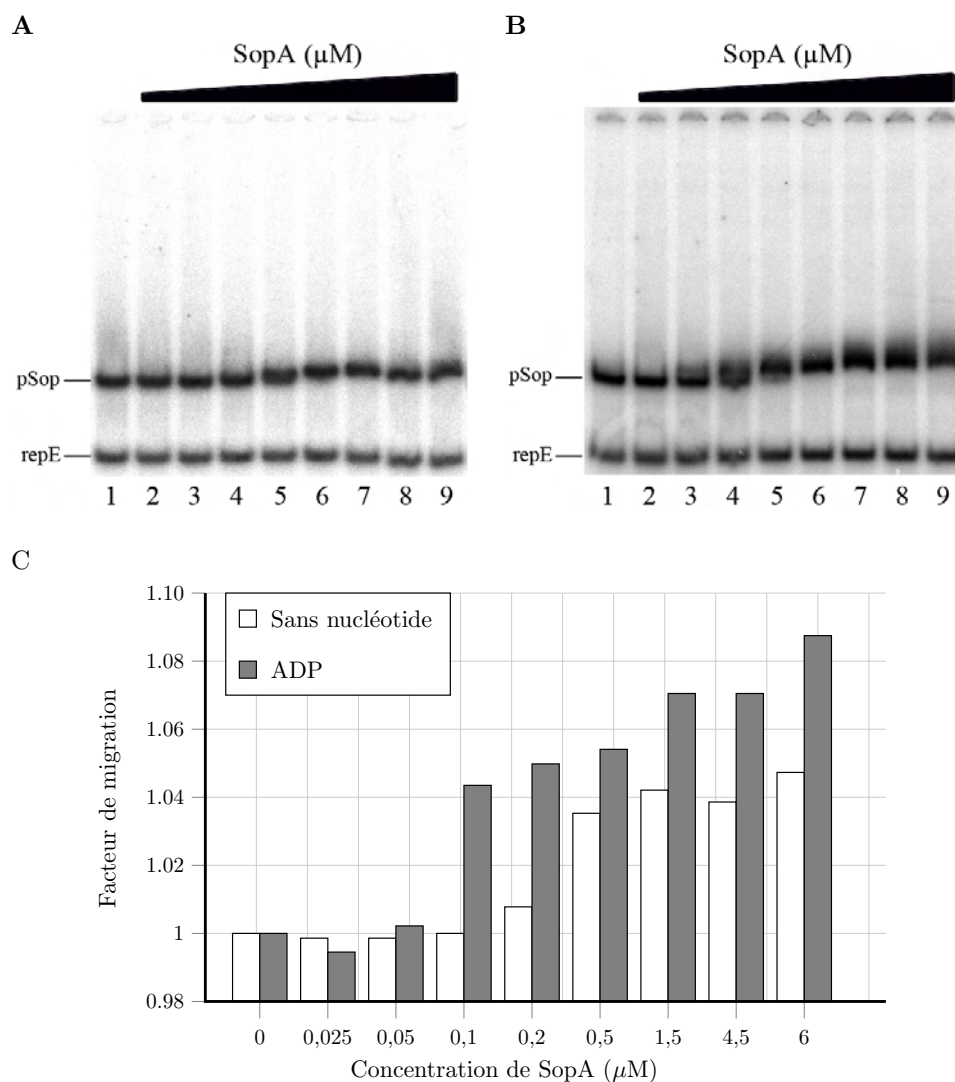


Figure 45 – **SopA-ADP est la meilleure forme fixatrice de *pSop***

A et B) Comparaison des migrations en absence de nucléotide ou en présence d'ADP. Les sondes *pSop* et *repE* sont incubées en absence (piste 1) ou en présence de SopA à des concentrations croissantes (0,025 μM piste 2; 0,05 μM piste 3; 0,1 μM piste 4; 0,2 μM piste 5; 0,5 μM piste 6; 1,5 μM piste 7; 4,5 μM piste 8; 6 μM piste 9). De la BSA (100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) et de l'ADN compétiteur (100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) sont ajoutés dans le tampon de réaction. Les migrations électrophorétiques sont réalisées dans un gel polyacrylamide TBM 6% pendant 6h, en absence de nucléotide (A) ou en présence d'ADP dans la réaction, dans le gel, dans le tampon de migration (B). Les positions des sondes *pSop* et *repE* en absence de protéines sont indiquées à gauche. C) Analyse du facteur de retard en fonction de la concentration de SopA. Les retards de migration des sondes, en absence de nucléotide (barres blanches) et en présence d'ADP (barres grises) sont analysés et représentés en histogramme. Les distances de migration D1 du puit à la sonde *repE* et D2 du puit à la sonde *pSop* sont mesurées pour chaque piste. Le facteur de migration D1/D2 est calculé et représenté en fonction de la concentration de SopA. Le facteur de migration pour l'ADN libre est normalisé à 1.

pour la stimulation de l'hydrolyse de l'ATP *in vitro* est en concordance avec le profil observé pour l'activité de répression *in vivo*.

La stimulation de l'activité ATPase pourrait fournir dans la cellule une concentration de SopA-ADP et/ou de SopA libre qui agissent en réprimant le promoteur *pSop*. La perte de cette stimulation de l'activité ATPase, enlève la répression du promoteur et par conséquent les protéines Sop sont surproduites ce qui est en accord avec nos observations. ParA de P1 possède aussi une activité de régulation de l'opéron *parAB*. En présence d'ADP, ParA possède une meilleure affinité pour son promoteur et en absence de nucléotide ParA ne fixe pas le promoteur (Bouet and Funnell, 1999; Davey and Funnell, 1997). SopA reconnaît son promoteur en présence d'ADP mais aussi en absence de nucléotide (Bouet et al., 2007; Mori et al., 1989). Afin de savoir si SopA possède une meilleure affinité à son promoteur en présence d'ADP, nous avons analysé l'interaction de SopA avec son promoteur par des expériences de retard sur gel (Figure 45). Nous avons utilisé deux sondes d'ADN radiomarquées. La sonde nommée *pSop* est un fragment d'ADN de la région promotrice de l'opéron *sopAB* qui contient les sites de fixation de SopA. La sonde nommée *repE* représente un fragment d'ADN non spécifique. Afin d'éliminer toute activité de fixation non spécifique, nous avons ajouté de l'ADN compétiteur non spécifique et non marqué en excès dans la réaction. Comme la dissociation du complexe SopA-ADP vers la forme SopA libre est très rapide (Bouet et al., 2007), nous avons donc réalisé les expériences de retard sur gel dans des conditions où l'on maintient l'ADP tout au long de la migration. Pour cela l'ADP est rajouté dans le gel et dans le tampon de migration. Les retards de migration en absence de nucléotide (Figure 45A) et en présence d'ADP (Figure 45B) sont minimes mais détectables et sont donc analysés et comparés. Comme attendu, en présence de SopA, *pSop* est retardé spécifiquement mais pas *repE* (Figure 45A, piste 5-9). Plus on augmente la concentration de SopA, plus le retard de *pSop* est important. Lorsque l'on ajoute de l'ADP dans la réaction, *pSop* est également retardé et le retard est aussi dépendant de la concentration de SopA (Figure 45B, piste 4-9). Pour chaque piste, un facteur de migration du fragment *pSop* est calculé en fonction du fragment *repE* qui n'est pas retardé (Figure 45C). Ce facteur est égal à la distance de migration du fragment *repE* divisée par la distance de migration du fragment *pSop*. Le facteur de migration pour l'ADN libre est normalisé à 1. Un retard du fragment *pSop* sera observé lorsque le facteur de migration sera supérieur à 1. En présence d'ADP, on observe un retard du fragment *pSop*, à partir d'une concentration de 0,1 μ M de SopA (Figure 45B, piste 4). En absence de nucléotide, il faut doubler la concentration de SopA pour commencer à observer un retard du fragment *pSop* (Figure 45A, piste 5). Dans les deux cas, plus on augmente la concentration de SopA, plus on augmente le retard.

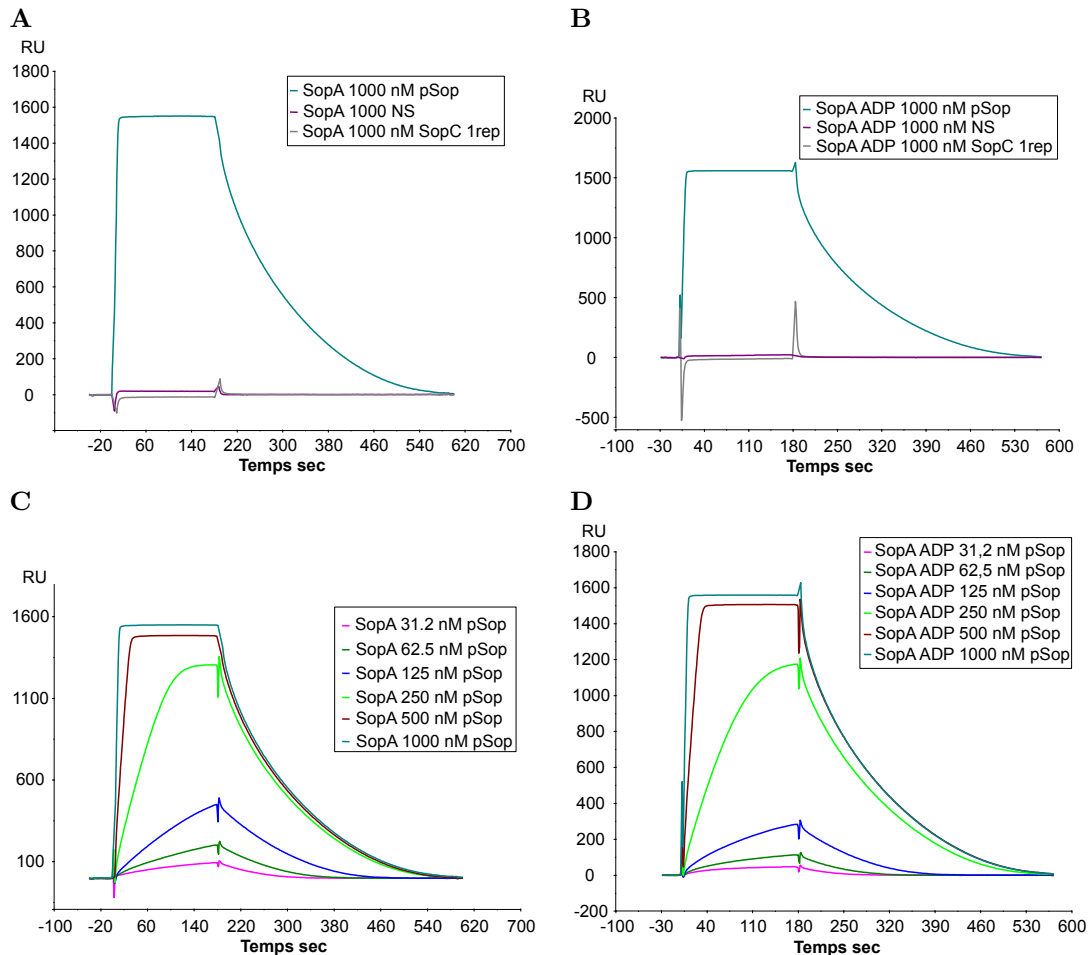


Figure 46 – Analyse de l'interaction de SopA avec le promoteur *sop* par résonance plasmon de surface

Les résultats exprimés en RU représentent la différence calculée entre les signaux obtenus pour la piste ADN et la piste sans ADN en fonction du temps (secondes). A,B) Interaction de SopA avec l'ADN. SopA est injectée à une concentration de 1 μ M en absence (A) ou en présence (B) d'ADP au temps 0 sec, sur des sondes d'ADN spécifiques immobilisées contenant le site de fixation de SopA (pSop) ou des sondes d'ADN non spécifiques immobilisées (NS et SopC 1rep). C,D) Dose réponse de SopA sur pSop. SopA est injectée à des concentrations de 31,2 nM à 1 μ M sur des sondes immobilisées pSop.

Cependant, en présence d'ADP, les retards de migration sont plus importants qu'en absence de nucléotide. Ces résultats semblent indiquer que SopA a une meilleure affinité pour son site de fixation sur l'opéron *sopAB* en présence d'ADP. Ceci suggère que SopA adopte une conformation plus favorable à son activité de répresseur en présence d'ADP. Une autre explication pourrait être que le changement de conformation induit par la fixation de l'ADP (Libante et al., 2001) provoque un retard plus important sans que l'affinité ne soit changer.

Afin de discriminer ces deux hypothèses, nous avons testé l'interaction de SopA avec son promoteur par des expériences de résonance plasmon de surface (SPR). La protéine SopA est immobilisée sur une sonde d'ADN de 136pb contenant soit les sites de fixation de SopA (pSop), soit un ADN non spécifique (NS) soit une répétition du site *sopC* (SopC) (Figure 46A,B). En présence et en absence d'ADP, SopA interagit spécifiquement avec son promoteur à des taux similaires et ne fixe pas les sondes non spécifiques NS et SopC. Nous avons ensuite mesuré l'interaction spécifique à pSop en fonction de la concentration de SopA (Figure 46C, D). En présence et en absence d'ADP, l'interaction augmente en fonction de la concentration de SopA et les taux observés dans les deux conditions sont comparables. Les constantes d'affinité calculées sont d'environ de 600 et 500 nM pour SopA-ADP et SopA libre respectivement. Comparé à l'interaction que possède SopB à *sopC* (constante d'affinité de 3nM) l'interaction de SopA avec le promoteur *pSop* est faible, ce qui est confirmée par les observations en retard sur gel.

Contrairement aux expériences de retard sur gel, les expériences de SPR nous indiquent qu'en présence d'ADP SopA interagit avec son promoteur avec la même affinité qu'en absence d'ADP. La différence constatée par les expériences de retard sur gel pourrait être due à la conformation adoptée par SopA en présence d'ADP qui pourrait ajouter un encombrement stérique supplémentaire dans le gel et augmenter légèrement le retard.

3.C Discussion et perspectives

Dans cette étude, nous avons montré qu'*in vivo*, la stimulation de l'activité ATPase de SopA est impliquée dans deux fonctions différentes, dans la répression de l'opéron *sopAB* et dans la stabilisation du plasmide F. Ces deux fonctions peuvent être distinguées et s'appliquer à deux niveaux différents de la partition. Le premier niveau concernerait le contrôle de la quantité de protéines SopA et SopB dans la cellule, et le deuxième niveau concernerait un mécanisme du système de partition. Une déficience de la répression du promoteur *pSop* peut ne pas être délétère pour la partition. En effet, dans un système, où SopA et SopB sont sur-produites, le plas-

mide mini-F est stable ou très peu déstabilisé. En revanche une déficience dans un mécanisme du système de partition sera délétère pour la partition du plasmide.

Nous avons montré que la perte de la stimulation de l'activité ATPase a une influence sur la régulation de l'opéron *sopAB*. En effet, les mutants de SopB déficients pour la stimulation de SopA, ne co-répriment plus pleinement le promoteur *pSop*. Une explication simple est que l'activation de l'hydrolyse de l'ATP fournirait les formes répresseurs SopA-ADP ou SopA libres qui ont la même affinité pour le promoteur *pSop*. La régulation de l'opéron *sopAB* est d'une part dépendant de la stimulation de l'activité ATPase de SopA et d'autre part proportionnelle au niveau de stimulation. En effet, les mutants qui ont une perte intermédiaire de la stimulation de SopA, ont aussi une perte intermédiaire de la répression de l'opéron *sopAB*. Par conséquent, plus on avance dans les étapes de partition, plus il y a de complexes de partition formés et plus le promoteur *pSop* sera réprimé, car en présence du complexe de partition, la stimulation de l'activité ATPase est plus importante (Ah-Seng et al., 2009). Ceci suggère que la répression du promoteur *pSop* serait plus importante pour les étapes finales de la partition, ou que la transcription aurait lieu uniquement au moment de la réplication et que le promoteur serait définitivement réprimé jusqu'à la prochaine réplication.

Ici nous mettons aussi en évidence que la perte de la stimulation de l'activité ATPase n'a pas la même influence sur la stabilité des plasmides selon que les protéines SopA et SopB sont produites en *cis* avec le site *sopC* ou en *trans*. En effet, lorsque les protéines sont produites en *cis*, les pourcentages de perte des plasmides portant les mutations *sopB^{R36A}*, *sopB^{R36K}* et *sopB^{R42A}* ne sont pas significativement différents du pourcentage de perte du plasmide portant *sopB* (tableau 2). Dans ce système *cis*, une influence de la perte de la stimulation de l'activité ATPase sur la stabilité des plasmides est observée seulement dans un contexte d'incompatibilité (tableau 3). Dans notre expérience, nous avons utilisé des vecteurs qui sur-produisent SopA et SopB ce qui mime les conditions expérimentaux de Bouet et collaborateurs (Bouet et al., 2005), lorsque l'apport supplémentaire de SopA et de SopB est fournie en *trans*. Nous observons également qu'en présence de plusieurs sites *sopC* portés par un plasmide à haut nombre de copies, la perte du mini-F est importante. Bouet et collaborateurs (Bouet et al., 2005) ont expliquée cette observation par le fait que la sur-production de SopA *in vivo* perturbe la formation du complexe de partition, car cet excès de SopA est capable d'enlever une partie du déficit de supertours négatifs créé par SopB fixé sur l'ADN (Lemonnier et al., 2000). Cependant, dans notre étude, l'incompatibilité est réduite en présence des plasmides qui produisent des mutants de SopB déficients dans la stimulation de l'activité ATPase de SopA. On pourrait penser que la perte de la stimulation de l'activité ATPase ne permet plus à l'excès

de SopA de perturber le complexe de partition. Hors, il a été montré qu'un mutant de SopA (SopA-K120R) déficient pour l'hydrolyse de l'ATP est toujours capable de perturber la formation du complexe de partition (Libante et al., 2001). Ceci suggère que le taux de perte important du plasmide mini-F observé dans un contexte d'incompatibilité en présence d'une sur-production de SopA et de SopB, n'est pas du à la perturbation du complexe de partition par l'excès de SopA. Par conséquent, un autre mécanisme doit être responsable de la déstabilisation du mini-F dans ces conditions et l'activation de l'hydrolyse de l'ATP de SopA est nécessaire pour ce mécanisme.

Au vu de nos résultats obtenus dans le contexte d'incompatibilité, nous avons testé la possibilité qu'il puisse exister un effet *trans* sur la stabilité des plasmides. Lorsque les protéines SopA et SopB sont produites en *trans*, le plasmide mini-F est stable, mais en présence des protéines SopB déficientes pour la stimulation de l'activité ATPase, les mini-F sont perdus au cours des générations. Dans ce contexte de production en *trans* des protéines, la stimulation de l'activité ATPase de SopA est importante pour la stabilisation du mini-F. Comment expliquer que la perte de la stimulation de l'activité ATPase peut avoir un effet sur la stabilité du plasmide mini-F lorsque les protéines sont produites en *trans*? Dans les conditions où les gènes *sopA* et *sopB* sont en *cis* avec *sopC*, la proximité de la transcription et de la traduction permettraient à SopB de trouver facilement son site centromérique afin de former le complexe de partition. Lorsque les protéines sont produites en *trans*, une dilution de la concentration locale des protéines due à l'éloignement de la traduction peut limiter soit la formation du complexe de partition, ou soit réduire l'action de SopA sur le complexe de partition. Cependant, d'une part, *in vivo*, SopA se regroupe en amas et oscille dans la cellule. Ce qui suggère que la production en *trans* de SopA n'a pas comme conséquence la dilution de la protéine. D'autre part, le complexe de partition doit pouvoir se former car le plasmide F est parfaitement stable en présence de la protéine SopB sauvage, et les mutations R36 n'influencent pas l'interaction de SopB avec *sopC* (Ah-Seng et al., 2009). Néanmoins, il se peut que l'extension du complexe de partition soit réduite à cause de la dilution de SopB, ce qui peut être une limite pour le bon fonctionnement de la partition. Un mutant déficient pour la stimulation de l'activité ATPase de SopA pourrait apporter une contrainte supplémentaire qui serait délétère pour la stabilité du plasmide. Dans ce cas, c'est l'action de SopA sur le complexe de partition qui serait limitante.

Cette explication n'est cependant pas complètement cohérente avec les données d'incompatibilité. En effet, dans notre expérience d'incompatibilité, les protéines sont produites en *cis* et l'hypothèse de la dilution des protéines ne s'applique pas dans ce cas. Je pense qu'une autre hypothèse pourrait expliquer les résultats obtenus

dans les conditions *cis* et *trans*. Ringgaard et collaborateurs (Ringgaard et al., 2009) ont récemment montré par alignement de séquences, que l'arginine 26 de ParB codé par le locus *par2* de pB171 correspond au motif arginine finger (R19) de ParG codé par le locus *parFG* du plasmide TP228 (Barillà et al., 2007). La mutation *parB*^{R26A} induit une perte de la stabilité des plasmides et influence la dynamique de ParA *in vivo*. En effet, l'oscillation de ParA est observée seulement dans 15% des cellules, alors que pour le gène *parB* sauvage, l'oscillation est observée dans 100% des cellules. Bien que la stimulation de l'activité ATPase de ParA n'ait pas été testée, il est possible que ParB^{R26A} soit comme ParG^{R19A} déficiente pour l'activation de l'ATPase. Dans ce cas, ces résultats suggèreraient que la stimulation de l'activité ATPase de ParA est nécessaire pour l'oscillation de ParA. Par corrélation, l'oscillation de SopA pourrait aussi nécessiter l'activation de l'hydrolyse de l'ATP, et la perte de l'oscillation pourrait induire un défaut de partition. Cependant comment expliquer les effets *cis trans* observés dans nos expériences. Des études *in vivo* sur la localisation de SopB ont montré que SopB a une localisation distribuée tout le long de la cellule en présence de SopA (Hirano et al., 1998). En présence de SopA et de *sopC*, SopB est localisée au centre des cellules ou au position $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ des cellules (Adachi et al., 2006). En présence de *sopC*, SopB occupe aussi ces positions (Adachi et al., 2006). Bien que la majeure partie des protéines SopB soit localisée dans la cellule dans un contexte *sopABC*⁺, il a été montré qu'une petite partie de SopB décrit des vagues d'oscillation dans la cellule succédant les vagues de SopA (Adachi et al., 2006). Un plasmide F *sopABC*⁺ se localise aussi au centre de la cellule ou au futur centre des cellules filles (Gordon et al., 1997; Niki and Hiraga, 1997) mais n'est pas statique, car une étude sur le suivie du plasmide F et de SopA montre que le plasmide F semble migrer vers l'amas de SopA (Hatano et al., 2007). Les auteurs proposent que la localisation du plasmide au centre de la cellule est un positionnement moyen dû à sa réorientation et à ses déplacements successifs (Figure 28B2). La localisation du plasmide nécessite les éléments du complexe de partition, car un plasmide mini-F Δ *sopABC* se positionne de manière aléatoire dans les cellules.

Au vu de ces données, il semblerait que l'oscillation de SopA nécessiterait la stimulation de son activité ATPase. L'oscillation de SopA entraînerait une partie de SopB dans la cellule. Cette mobilisation de SopB serait par conséquent dépendante de la stimulation de l'activité ATPase. Bien que SopB soit capable de se fixer à *sopC* en absence de SopA, l'oscillation de SopA et la mobilisation de SopB pourraient participer d'une part à la formation du complexe de partition, et d'autre part à la localisation du complexe de partition au centre des cellules. A ce niveau, le complexe de partition est capturé par les protéines SopB et y restera jusqu'au moment où les substrats de partition seront séparés. La séparation des plasmides ne nécessite pas

la stimulation de l'activité ATPase de SopA, car un plasmide produisant un mutant de SopB déficient pour cette stimulation en *cis* avec *sopC*, est relativement stable. Ceci suggère que les étapes de séparation des plasmides ne sont pas déficientes en présence de ce mutant et qu'un autre mécanisme serait impliqué dans la séparation des plasmides, comme par exemple la polymérisation de SopA. Dans ce modèle, la stimulation de l'activité ATPase serait essentielle pour le déplacement de SopB et par conséquent serait impliquée indirectement dans la localisation des plasmides. Une étude dans notre équipe montre qu'une séquence d'ADN contenant le site *sopC*, injectée dans une bactérie par l'intermédiaire d'un bactériophage, migre du point d'infection au centre de la cellule en présence de SopA et de SopB (Rech et Lane données non publiées). Ces résultats montrent qu'une molécule d'ADN qui possède *sopC* peut être déplacée au centre de la cellule.

Ce modèle peut expliquer les différences observées lorsque les protéines SopA et SopB sont produites en *cis* avec *sopC* ou en *trans* (Figure 47). En effet, lorsque SopB est produite en *cis*, la proximité du site *sopC*, permet une interaction directe entre les deux partenaires. Dans ce cas les protéines SopB mobilisées par SopA grâce à la stimulation de l'activité ATPase, ne sont pas nécessaires pour rapprocher le complexe de partition au centre des cellules. La perte de la stimulation de l'activité ATPase n'aurait donc aucun effet ou un effet mineur sur la partition des mini-F. En revanche, si les protéines sont produites en *trans*, la mobilisation de SopB par SopA est nécessaire pour aller à la rencontre du complexe de partition. La perte de la stimulation de l'activité ATPase de SopA aurait comme conséquence une mobilisation moins efficace de SopB, ce qui conduirait à une perte de la localisation des plasmides. Cet effet sera proportionnel au taux de perte de l'activité de stimulation. Dans un contexte d'incompatibilité, la mobilisation de SopB par SopA, aurait pour conséquence le regroupement des complexes de partition illégitimes formés sur les sites de *sopC* portés par les plasmides à haut nombre de copies. Ceci augmente la possibilité de séparer deux types de plasmides sans distinction. Les plasmides à bas nombre de copies sont désavantagés dans ce système. La perte de la stimulation de l'activité ATPase conduirait à une diminution de la mobilisation de SopB et par conséquent à une diminution de la localisation des complexes de partition illégitimes et donc une diminution de la perte des plasmides mini-F.

J'ai extrapolé ce modèle en me basant aussi sur des données expérimentales ultérieures, afin de placer la stimulation de l'activité ATPase de SopA dans le mécanisme de partition. Cependant si on se restreint à notre étude, l'hypothèse qui pourrait expliquer l'effet *cis trans* observé est que la stimulation de l'activité ATPase de SopA pourrait être nécessaire pour la mobilisation de SopB et pour la localisation des plasmides. Il me semble important de poursuivre cette étude, car il

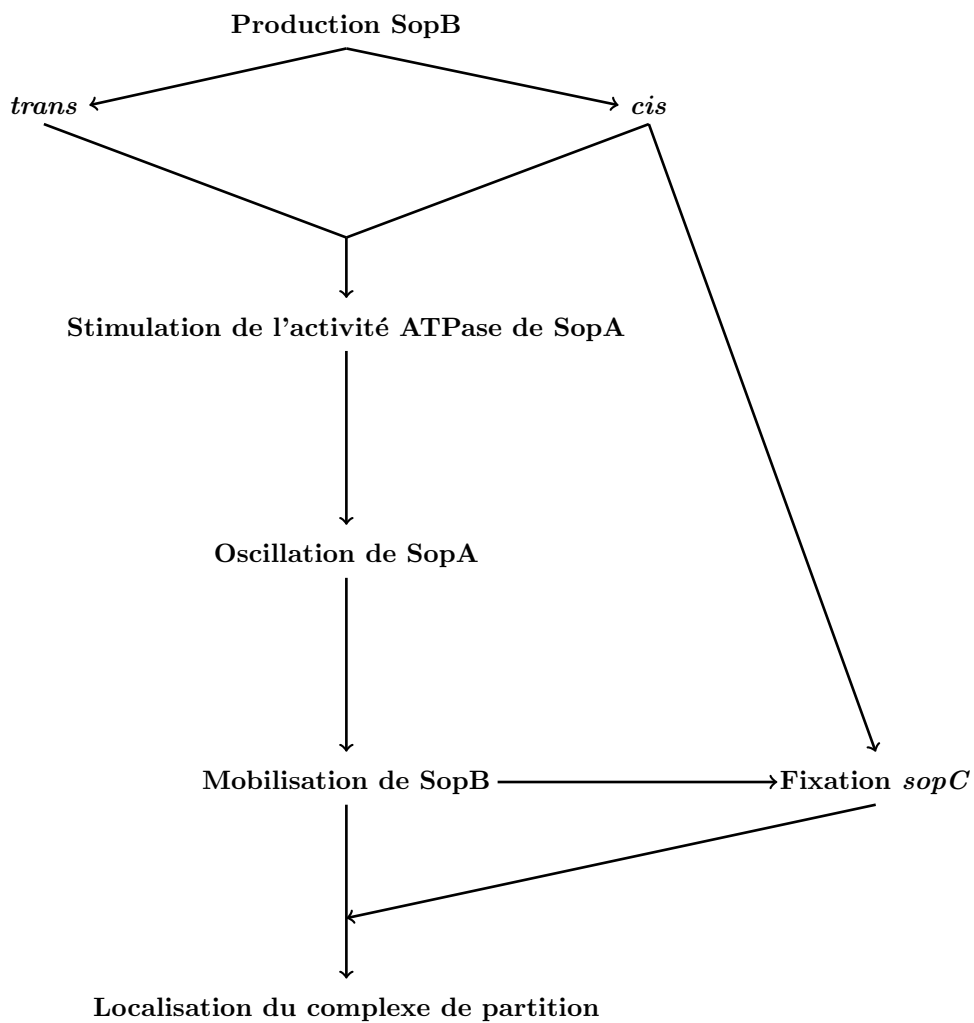


Figure 47 – Représentation schématique du modèle *cis/trans*

est claire que la stimulation de l'activité ATPase de SopA possède une fonction dans la partition. L'effet *cis trans*, nous a permis d'émettre l'hypothèse que cette fonction serait de permettre l'oscillation de SopA. Ce modèle n'est encore qu'à l'état d'hypothèse, et nous pouvons proposer plusieurs expériences pour le tester. Dans un premier temps, le test primordial serait de regarder la dynamique de SopA *in vivo*, en présence de mutants de SopB produites toutes les deux en *trans*. Il serait aussi intéressant de voir si la perte de la stimulation de l'activité ATPase de SopA a une influence sur la stabilité des mini-F dans un système où SopA est produite en *trans* et SopB en *cis* avec *sopC*. Si dans ces conditions, on n'observe aucun effet sur la stabilité des plasmides, ceci validerait l'hypothèse que la stimulation de l'activité ATPase de SopA serait importante pour la mobilisation de SopB. En effet, les protéines SopB produites en *cis*, n'ont pas besoin d'être mobilisées pour interagir avec le complexe de partition formé à proximité. Ensuite, on pourrait étudier l'influence de la perte de la stimulation de l'activité ATPase sur la localisation des mini-F lorsque les protéines SopA et SopB sont produites en *trans*. Si notre modèle se vérifie, les mini-F devrait avoir une localisation aléatoire dans les cellules qui expriment les protéines SopB déficientes pour la stimulation de SopA. On pourrait aussi étudier le positionnement de la séquence d'ADN contenant *sopC*, injectée par l'intermédiaire de bactériophages dans une cellule qui exprime un mutant de SopB déficient pour la stimulation de SopA. Une localisation aléatoire de la séquence d'ADN contenant *sopC* validerait notre modèle. Si notre hypothèse se confirme, on pourrait se poser la question du mécanisme qui permet la mobilisation de SopB. Comment la stimulation de l'activité ATPase intervient au niveau protéique pour permettre une dynamique de SopB? En sachant que les mutants de SopB sont toujours capables d'interagir avec SopA (Ah-Seng et al., 2009), une possibilité serait que l'intensité de l'interaction SopA-SopB puisse changer en fonction de l'activation de l'hydrolyse de l'ATP. En hydrolysant l'ATP, un changement de conformation de SopA pourrait permettre une interaction plus stable entre SopA et SopB, et par conséquent permettre la mobilisation de SopB.

Troisième partie

Conclusion

Les travaux réalisés au cours de ma thèse, nous ont permis de mieux appréhender le mécanisme de partition. Dans un premier temps, nous avons mis en évidence une activité de fixation non spécifique à l'ADN de SopA et caractérisé les conditions nécessaires pour la polymérisation de SopA. En se basant sur cette étude, nous avons proposé un modèle concernant les étapes tardives de la partition, qui prévoit la séparation des plasmides par l'intermédiaire de la polymérisation de SopA. Ensuite nous avons caractérisé les interactions nécessaires à SopA pour l'activation de l'hydrolyse de l'ATP. Suite à cette étude, nous avons émis l'hypothèse que la stimulation de l'activité ATPase de SopA serait importante pour l'inhibition de la polymérisation de SopA, pour la dépolymérisation des filaments et pour la régulation de l'opéron *sopAB*. Ces trois fonctions auraient leur place soit dans les premières étapes de la partition (inhibition de la polymérisation de SopA et régulation de l'opéron), soit dans les dernières étapes de la partition (dépolymérisation des filaments). Les études *in vivo* que nous avons entrepris nous ont permis d'une part de confirmer le rôle de la stimulation de l'activité ATPase de SopA dans la régulation de l'opéron *sopAB* et d'autre part de mettre en évidence un rôle de la stimulation de l'activité ATPase dans une fonction de la partition qui agirait en *trans*. Cette fonction pourrait concerner l'oscillation de SopA qui serait requise pour la localisation des plasmides. Depuis ces dernières années, deux modèles se confrontent pour expliquer la séparation des plasmides, le modèle de réaction diffusion et le modèle de « pushing/pulling ».

Le modèle de réaction diffusion (Figure 48) pour les systèmes de partition a été proposé par Hunding et collaborateurs (Hunding et al., 2003) sur la base du modèle de réaction diffusion de MinCDE (Meinhardt and de Boer, 2001). L'oscillation de ParA serait nécessaire pour recruter et déplacer le complexe de partition dans la cellule. L'ADN du nucléoïde servirait de matrice sur laquelle s'oligomérisent et se déplacent ParA-ATP. Le déplacement de ParA serait dû à l'hydrolyse de l'ATP stimulée par ParB et aussi par l'ADN. La forme ParA-ADP se détacherait de l'ADN avant de relâcher l'ADP. ParA fixerait ensuite une molécule d'ATP et reconnaîtrait à nouveau l'ADN non spécifique. Le système *sopABC* du plasmide F est un cas particulier, car l'ADN inhibe la polymérisation. Cependant, on ne peut pas exclure que la masse de SopA qui interagit avec l'ADN et oscille dans la cellule, déplace le complexe de partition par l'intermédiaire de la réaction diffusion.

Le modèle « pushing/pulling », repose sur la séparation des plasmides par l'intermédiaire des polymères de SopA pouvant pousser ou tirer les plasmides de part et d'autre de la cellule. Ce modèle peut intégrer le modèle proposé par notre équipe dans lequel l'initiation de la polymérisation de SopA s'effectue dans une zone où l'ADN est masqué par SopB (Bouet et al., 2007). Hors de cette zone, l'ADN inhibe-

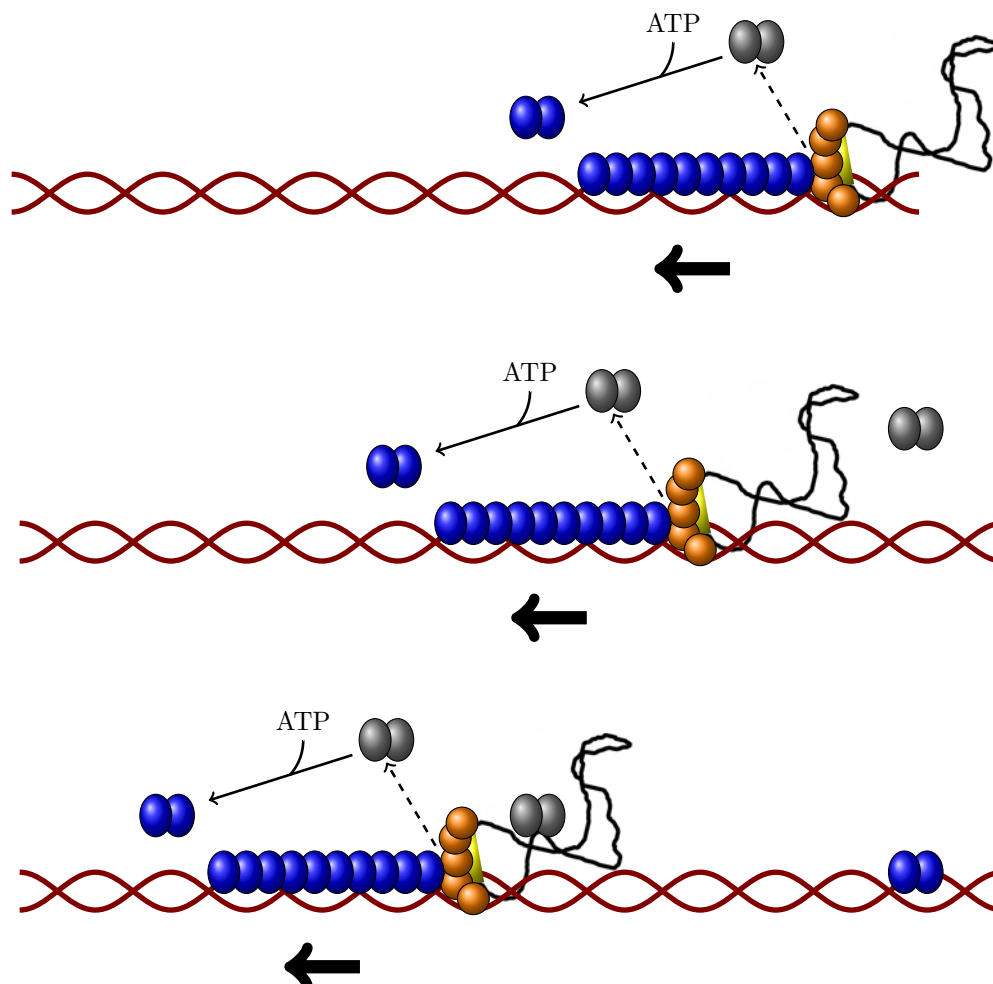


Figure 48 – **Modèle de réaction diffusion**

Représentation schématique du mécanisme de réaction diffusion. ParA-ATP (ellipse bleu) se fixe à l'ADN (trait marron) et interagit avec ParB (cercle orange) fixé au site *parS* (jaune) du plasmide (trait noir). Cette interaction stimule l'hydrolyse de l'ATP et libère ParA-ADP (ellipse grise) de l'ADN. ParA-ADP diffuse dans le cytoplasme de et peut fixer une autre molécule d'ATP et se lier à nouveau à l'ADN. Ce mécanisme de réaction diffusion, permettrait le déplacement des plasmides.

rait la polymérisation de SopA. Ainsi SopA serait recrutée au niveau du complexe de partition, et pourrait former un ou plusieurs polymères pouvant séparer les plasmides dans deux compartiments différents de la cellule. Pour le modèle de « pushing », la zone où l'ADN est masqué serait progressivement réduite au cours de la séparation des plasmides, jusqu'au moment où les polymères de SopA rencontreraient à nouveau de l'ADN (Figure 49). La dépolymérisation serait alors initiée. Pour le modèle de « pulling », on peut imaginer que les polymères se formeraient également dans la zone couverte par SopB (Figure 50). Au moment où les polymères rencontrent la zone d'ADN non masqué, la dépolymérisation est initiée, et on peut imaginer qu'à ce niveau l'hydrolyse de l'ATP pourrait produire la force motrice nécessaire pour déplacer les plasmides.

Ces modèles ne sont pas parfaits, et soulèvent beaucoup de questions. Par exemple, dans un modèle de réaction diffusion, comment reconnaître les différents complexe de partition, les séparer de manière bidirectionnelle et les maintenir aux position $\frac{1}{4}$, $\frac{3}{4}$? Ou encore, comment les polymères se forment, se stabilisent et s'orientent dans un modèle de « pushing/pulling »? La stimulation de l'activité ATPase de SopA, s'intègre parfaitement dans le modèle de réaction diffusion. Elle est même un des maillons de la chaîne du modèle, alors que pour le modèle de « pushing/pulling », l'activité basale de l'hydrolyse de l'ATP de SopA pourrait suffire à séparer les plasmides. Nos travaux *in vivo*, suggèrerait que la stimulation de l'activité ATPase de SopA pourrait avoir une fonction dans un mécanisme qui agirait en *trans* dans la partition et ce mécanisme serait important pour la partition, seulement si les protéines sont produites en *trans*. Ceci me mène à la conclusion que ces deux modèles pourraient exister *in vivo*, mais ils ne seraient pas tous les deux impliqués aux mêmes étapes du processus de ségrégation. Je propose que la réaction diffusion soit impliquée dans l'oscillation de SopA et surtout aurait pour fonction de positionner convenablement les plasmides répliqués au cours de la croissance de la bactérie. Ensuite, lorsque les plasmides sont positionnés, ils seront séparés par les polymères de SopA. Une autre fonction de l'oscillation de SopA pourrait être de conserver le positionnement des plasmides après leur séparation.

Bien que toute mon argumentation se base sur le faite que la stimulation de l'activité ATPase ne s'effectue plus au niveau du complexe de partition lorsque le complexe étendu est formé, on ne peut pas exclure l'argumentation contraire. Dans ce cas, si la stimulation de l'activité ATPase a lieu au niveau du complexe de partition, elle serait responsable de la dépolymérisation. Pour le modèle « pushing », les polymères de SopA éloignerait rapidement les complexes de partition et la dépolymérisation serait s'initié par l'hydrolyse de l'ATP au niveau du complexe de partition, lorsque SopA serait à nouveau en contact avec l'ADN voisinant (Fig-

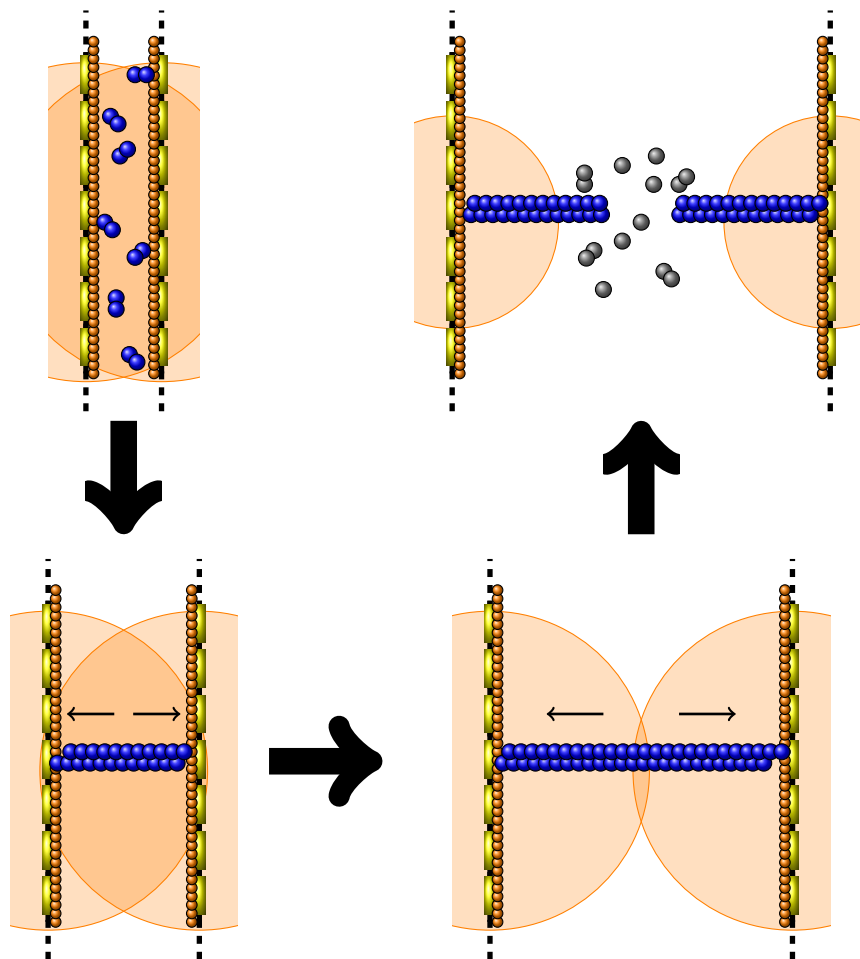


Figure 49 – Modèle de « Pushing » avec une dépolymérisation hors du complexe de partition

SopB (cercle orange) fixée au site *sopC* (rectangle jaune) des plasmides (traits pointillés noirs), s'étale sur l'ADN au voisinage des sites *sopC* ce qui permet la formation du complexe de partition étendu et la création d'une zone où l'ADN est masqué (surface orange). SopA (cercle bleu) s'assemble au niveau du complexe de partition et polymérise pour pousser les plasmides à des directions opposées dans la cellule. Au cours de la séparation des plasmides, l'ADN ne sera plus masqué et initie la dépolymérisation des polymères par l'hydrolyse de l'ATP produisant ainsi des molécules SopA-ADP ou SopA libre (cercle gris). Plusieurs polymères pourraient être impliqués dans la séparation des plasmides, mais pour simplifier les figures, un seul polymère est représenté pour tous les modèles dessinés.

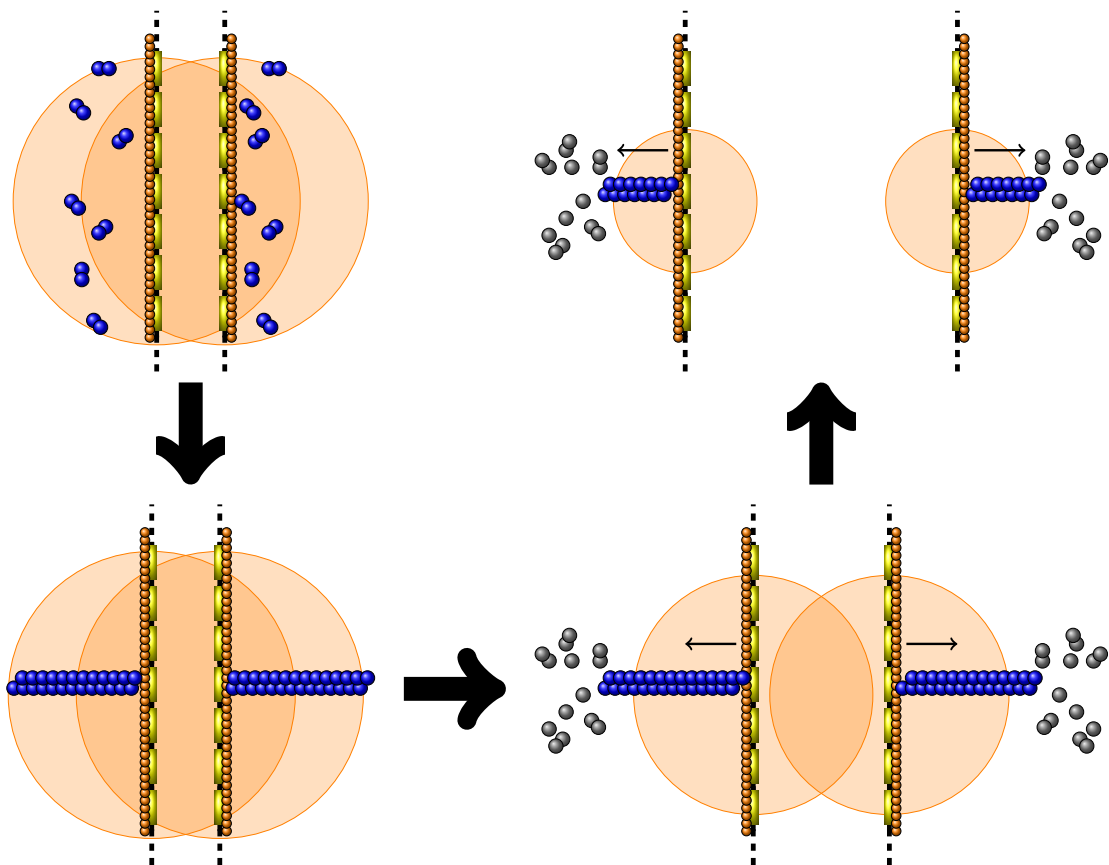


Figure 50 – Modèle de « Pulling » avec une dépolymérisation hors du complexe de partition

SopB (cercle orange) fixée au site *sopC* (rectangle jaune) des plasmides (traits pointillés noirs), s'étale sur l'ADN au voisinage des sites *sopC* ce qui permet la formation du complexe de partition étendu et la création d'une zone où l'ADN est masqué (surface orange). SopA (cercle bleu) s'assemble au niveau du complexe de partition et polymérise. L'extension des polymères est limitée par la zone où l'ADN n'est pas masqué. A cet endroit, la dépolymérisation des polymères est initiée par l'hydrolyse de l'ATP produisant ainsi des molécules SopA-ADP ou SopA libre (cercle gris). Cette réaction pourrait fournir la force motrice nécessaire pour déplacer les plasmides.

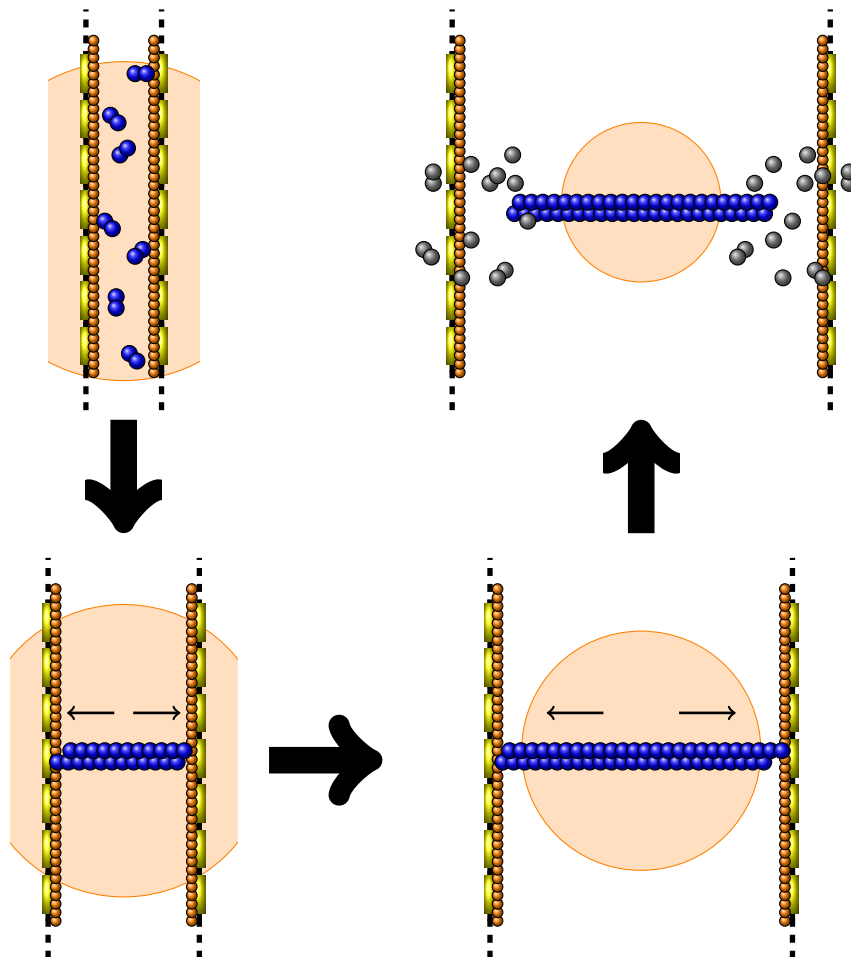


Figure 51 – Modèle de « Pushing » avec une dépolymérisation au niveau du complexe de partition

SopB (cercle orange) fixée au site *sopC* (rectangle jaune) des plasmides (traits pointillés noirs), s'étale sur l'ADN au voisinage des sites *sopC* ce qui permet la formation du complexe de partition étendu et la création d'une zone où l'ADN est masqué (surface orange). SopA (cercle bleu) s'assemble au niveau du complexe de partition et polymérise pour pousser les plasmides à des directions opposées dans la cellule. Au cours de la séparation des plasmides, l'ADN ne sera plus masqué et initie la dépolymérisation des polymères par l'hydrolyse de l'ATP produisant ainsi des molécules SopA-ADP ou SopA libre (cercle gris).

re 51). Pour le modèle de « pulling », l'activation de l'hydrolyse de l'ATP ne pourrait se faire que si le complexe de partition est structuré de manière à ce que de l'ADN nu puisse être présenté à SopA. La dépolymérisation serait alors initiée au niveau du complexe de partition, tirant ainsi les complexes dans le sens de la dépolymérisation (Figure 52). Ces quatre modèles restent spéculatifs et ne sont pas exhaustifs. D'autres études sont nécessaires pour les compléter et les discriminer. Il serait intéressant d'étudier la structure du complexe de partition *in vitro*, et de voir comment se forment les filaments sur les complexes de partition.

Enfin, on peut se poser la question de l'importance de l'activation de l'hydrolyse de l'ATP dans les conditions naturelles. En effet, dans la nature, les gènes *sopA* et *sopB* sont forcément exprimés en *cis* avec *sopC* sur les plasmides. Hors dans cette configuration, nous avons montré que la perte de la stimulation de l'activité ATPase a une influence minime sur la stabilité des plasmides. Pourquoi cette fonction est-elle conservée au cours de l'évolution ? Dans la configuration *cis*, l'influence de la perte de la stimulation de l'activité ATPase est notable dans un contexte d'incompatibilité. Dans la cellule, les protéines de partition, ne peuvent pas différencier les sites *sopC* du plasmide F, des sites *sopC* portés par un plasmide à haut nombre de copies. Tous les sites sans distinctions représentent pour les protéines de partition des substrats pour la formation des complexes de partition. Par conséquent, un taux d'incompatibilité élevé, reflète un bon fonctionnement de la partition et par corrélation, un taux d'incompatibilité faible reflète une activité de partition faible. Notre étude indique que la stimulation de l'activité ATPase de SopA est requise lorsque le système de partition doit gérer la ségrégation de nombreux sites centromériques. Ceci suggérerait que cette fonction pourrait être nécessaire pour le bon fonctionnement de la partition, lorsque les bactéries se développent dans une niche écologique qui favorise un nombre de copies important du plasmide F. Par ailleurs, nous travaillons au laboratoire avec un plasmide mini-F dix fois plus petit qu'un plasmide F, car les régions non essentielles à la répllication et à la partition du plasmide ont été délétées. Dans la nature, il est possible qu'un système défaillant pour la stimulation de l'activité ATPase de SopA ne serait pas suffisant pour partitionner les plasmides F.

Les travaux que nous avons réalisés soulèvent des questions sur les mécanismes de formation du complexe de partition et sur les mécanismes impliqués pour la localisation des plasmides. Comment se forme le complexe *in vivo* et est-ce que SopA participe à cette étape ? Quels sont les mécanismes qui permettent la localisation des plasmides ? Comme la perte de la stimulation de l'activité ATPase de SopA pourrait induire une défaillance dans les premières étapes de la partition, les outils moléculaires utilisés au cours de ma thèse, peuvent aider à explorer cette partie du

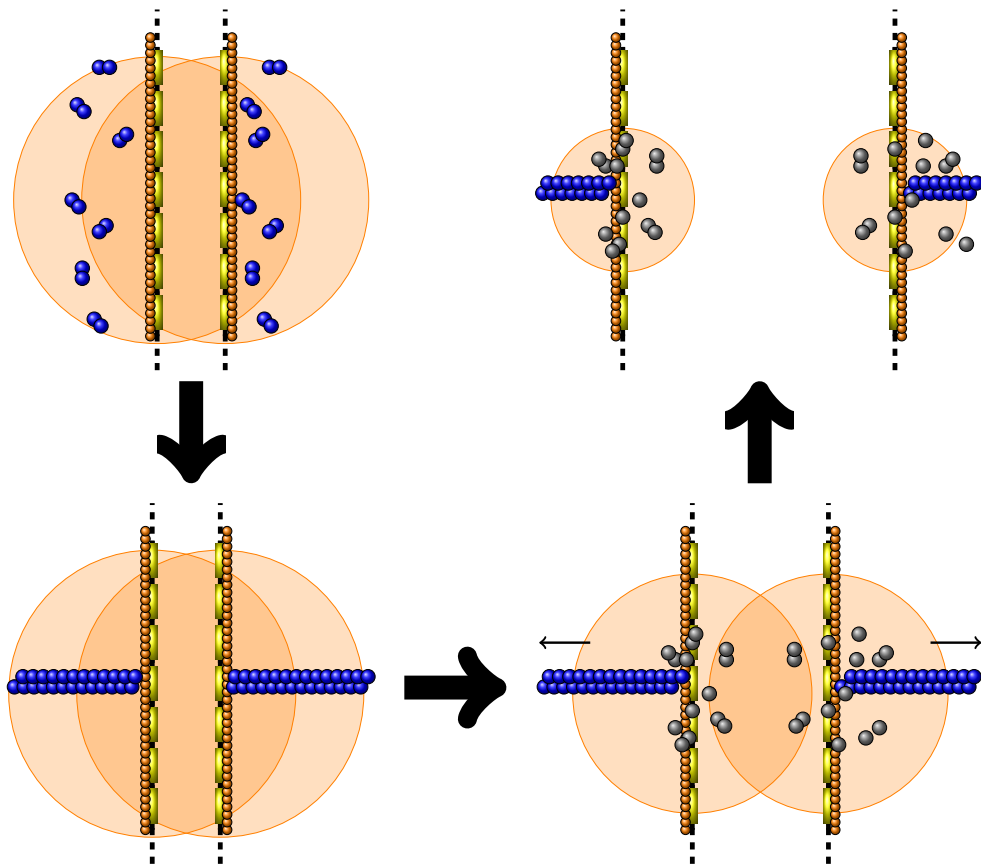


Figure 52 – Modèle de « Pulling » avec une dépolymérisation au niveau du complexe de partition

SopB (cercle orange) fixée au site *sopC* (rectangle jaune) des plasmides (traits pointillés noirs), s'étale sur l'ADN au voisinage des sites *sopC* ce qui permet la formation du complexe de partition étendu et la création d'une zone où l'ADN est masqué (surface orange). SopA (cercle bleu) s'assemble au niveau du complexe de partition et polymérise. L'extension des polymères se fait dans la zone où l'ADN est masqué. La dépolymérisation est initiée par l'hydrolyse de l'ATP au niveau du complexe de partition produisant ainsi des molécules SopA-ADP ou SopA libre (cercle gris). La dépolymérisation entraînerait de proche en proche le complexe de partition interagissant avec les polymères.

mécanisme de partition.

Quatrième partie
Matériels et méthodes

Plasmides, mutagenèse et ADN

Les plasmides et les oligonucléotides utilisés sont listés respectivement dans les tableaux 4 et 6. Nous avons utilisé le kit Stratagene Quickchange pour introduire les mutations ponctuelles dans *sopB* dans les différents plasmides utilisés. Cette stratégie se base sur l'amplification du plasmide à partir de deux oligonucléotides complémentaires possédant en leur centre la mutation souhaitée se fait grâce à l'ADN polymérase PFU Ultra II de Stratagene. Le produit d'amplification est ensuite soumis à l'enzyme DpnI qui clive les brins parentaux puis transformé dans une souche JS238 chimio-compétente. L'introduction de la mutation (dans les plasmides récupérés dans les transformants) est vérifiée par séquençage. Le plasmide pYAS1 est un dérivé du plasmide pTYB1 (NEBiolabs) où *sopB* amplifié par PCR à partir du vecteur pDAG170 (Bouet et al., 2007), est introduit en utilisant les enzymes de restriction NdeI et SapI. Les mutations sont introduites par Quickchange dans le pYAS1 et dans le pDAG170. Les variant des gènes *sopB* sont amplifiés par PCR à partir des dérivés du pDAG170 et introduites dans des plasmides mini-F qui sont soit des dérivés du pDAG114 (Ravin and Lane, 1999) ou soit des dérivés du pDAG173 (Libante et al., 2001) en utilisant les enzyme de restriction PvuI et SpeI. Le pYAS46, un dérivé du pAM238 (Gil, 1990), est construit par l'introduction d'un produit PCR de *sopA* dans le pAM238 en utilisant les enzymes EcoRI et BamHI. Les dérivés du pYAS46 possédant *sopB* ou les variants de *sopB* sont construits par l'introduction d'un produit PCR de *sopAB* dans le pYAS46 en utilisant les enzymes SnaBI et HindIII.

Les sondes d'ADN utilisées pour les expériences d'EMSA sont réalisées par amplification PCR, en présence de [α - 32 P]dATP. Les sondes *psop* (168 pb), *repE* (127 pb) sont amplifiées à partir de pDAG114, avec respectivement les oligonucléotides PsopA1-PsopA2 et RepE1-RepE2. La sonde *sopC* (144 pb) est amplifiée à partir de pJYB55 (Bouet and Lane, 2009), avec les oligonucléotides *SopC22-SopC23*. Les plasmides pZC204 (Yates et al., 1999) et pJYB57 (Ah-Seng et al., 2009) contenant le site centromérique *sopC* sont utilisés pour la microscopie électronique.

Purification de SopB

Les protéines SopB et les variants étiquetées inteine, sont purifiées à partir des souches C2833 (NEBiolabs). Les cultures de nuit en LB à 30 ° C sont diluées 100 fois et incubées à 42 ° C. A $DO_{600}=0,5-0,8$ la production des protéines est induites en ajoutant 0,4 mM d'isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside et les cultures sont incubées à 30 ° C à l'exception des cultures des mutants SopB^{A183P}, SopB^{K191A-R195A}

et SopB^{A183D-K191A-R195A} qui sont incubées à 20 ° C pendant 16 à 20h. Les cellules sont ensuite centrifugées à 6000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé, et le culot est repris dans 10 ml (pour 500 ml de culture) de tampon B (500mM NaCl, 1mM EDTA, 20 mM Hepes-KOH pH 7,8). 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de lysozyme sont ajoutés à la préparation avant d'être congelée rapidement dans de l'azote liquide. La préparation est décongelée pendant 2h à température ambiante, puis la lyse est effectuée par sonication dans de la glace (cycle de 10x20 seconde à 50%). Le lysat est centrifugé à 6000 rpm, le surnageant est récupéré, et centrifugé à nouveau à 6000 rpm. Le surnageant est récupéré, chargée sur une colonne de 5 ml de chitine à 4 ° C et lavé successivement avec 15 ml de tampon B, 50 ml de tampon B à 1 M NaCl et 15 ml de tampon B. La colonne est ensuite équilibrée rapidement avec 15 ml de tampon B contenant 50 mM de dithiothreitol et conservée pendant 16 à 20h à 4 ° C. La colonne est éluée avec 15 ml de tampon B, l'élué est dialysée contre du tampon S (10% glycérol, 0,1 mM EDTA, 40 mM Hepes KOH pH 7,8) à 50 mM KCl, chargée sur une colonne mono-S (Amersham Biosciences) et éluée avec un gradient de tampon S contenant 50 à 600 mM de KCl. Les protéines sont déposées sur gel SDS-PAGE et leur concentration est estimée au spectrophotomètre Thermo Scientific NanoDropTM 1000. Le peptide SopB-N52 est purifié comme les protéines SopB à l'exception des étapes de dialyse et de chargement sur les colonnes mono-S, qui sont remplacées par une étape de purification sur un amicon ultra 15-30K et par une étape de concentration sur un filtre vivaspin 6K. La concentration du peptide est estimée par NMR (Nuclear magnetic resonance). La purification de SopA est décrite dans [Bouet et al. 2007](#).

Test de l'activité ATPase

L'activité ATPase est mesurée par la quantité d'ADP formé lors de l'incubation de 2 μM de SopA dans 10 μl de tampon SCAB (50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 10% glycérol, 50 mM HEPES-KOH pH 7,8) contenant 1 mM $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. Les tests sont réalisés en présence ou en absence de 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ d'ADN spécifique (pJYB57) ou non (pBSKS) et en présence ou en absence de 2 μM de SopB. Les essais sont ensuite incubés à 37 ° C pendant 4h et les réactions arrêtées par l'ajout de 10 μl de tampon stop (3 mM ATP, 3 mM ADP et 50 mM EDTA). 1,5 μl de chaque essai est déposé sur une plaque TLC et la chromatographie se fait par capillarité dans du tampon composé de 1 M acide formique et de 0,5 M LiCl. Les plaques sont séchées et exposées sur un écran phosphore permettant l'analyse au PhosphorImager (Fuji FLA3000).

Test de retard sur gel

Les réactions (10 μ l) contiennent soit 1 nM de chaque ADN marqué au 32 P (*psop* et *repE*) ou soit 1 nM d'ADN marqué au 32 P (*sopC* ou *repE*) dans un tampon composé de 50 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10% glycérol, 1 mM de DTT. Dans certaines conditions, de l'ADN compétiteur de sperme de saumon soniqué (100 μ g.ml⁻¹) a été ajouté. Les mélanges réactionnels sont effectués dans de la glace et incubés pendant 15 min à 30 ° C. Ils contiennent soit de l'ADN seul, soit une concentration croissante de SopA (0,025 μ M, 0,05 μ M, 0,1 μ M, 0,2 μ M, 0,5 μ M, 1,5 μ M, 4,5 μ M, 6,5 μ M) ou soit une concentration croissante de SopB (0,01 μ M, 0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M). Ils sont ensuite analysés par électrophorèse dans un gel natif de polyacrylamide (6%) soit en TBM (90 mM Tris Borate, 10 mM MgCl₂), soit en TGE (90 mM Tris Glycine, 1 mM EDTA). Dans certaines expériences, les nucléotides adénine présents à 1 mM dans la réaction sont ajoutés dans le gel et le tampon du haut de migration (0,1 mM) (voir légende des figures). Une pré-migration est effectuée à 75 V pendant au moins 15 min à 4 ° C. Les échantillons sont chargés dans le gel à 75 V. La migration est effectuée à 160 V pour les échantillons contenant SopA et 180 V pour les échantillons contenant SopB pendant respectivement 6h et 4h à 4 ° C. Après fixation dans une solution contenant de l'acide acétique à 10% et du méthanol à 10% et séchage sur papier Whatman, les gels sont exposés sur écran phosphore et révélés au PhosphorImager (Fuji FLA3000).

Microscopie électronique

SopA, SopB et sopC (pZC204) sont dilués dans le tampon PA (50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 mM Hepes-KOH pH 7,5) et centrifugés à 21000g pendant 30 min à 4 ° C. Les mélanges sont effectués à température ambiante et incubés 10 min à 30 ° C. Les réactions sont incubées 5 min à température ambiante en présence ou en absence de 1 mM ATP. Des grilles en cuivre de 400 ou 300 trous, préalablement carbonisées et ionisées, sont appliquées sur les réactions pendant 1 min. Les échantillons sur les grilles sont colorés à l'acétate d'uranyle (1%) pendant 1 min et séchés. Les grilles sont observées avec un microscope électronique à transmission (Jeol 1200 EX). Les images sont capturées par une caméra digitale (AMT-USA) à un grossissement allant de 40x à 300000x.

Test de stabilité

Les tests de stabilité ont été réalisés comme décrit dans [Dubarry et al. 2006](#) dans les souches DH10B contenant les dérivés du pDAG114 ou du pDAG173 et dans les souches MC1061 contenant les dérivés du pAM238 en présence de pDAG209 ([Ravin and Lane, 1999](#)). Les tests d'incompatibilités sont faits dans les souches MG1655 contenant les dérivés du pDAG173 en présence du pZC20 ([Biek and Cohen, 1989](#)) ou du pZC314 ([Bouet et al., 2005](#)). Dans certains de ces tests, le pDAG115 ([Ravin and Lane, 1999](#)) est utilisé comme témoin négatif. Les milieux de culture utilisés sont les milieux MS1 (M9, 0,4% glucose, 0,2% CSA, 1 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂, 1 µg.ml⁻¹ vitamine B1, 40 µg.ml⁻¹ thymine, 20 µg.ml⁻¹ leucine) et MS2 (M9, 0,4% glycérol, 1 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂, 1 µg.ml⁻¹ vitamine B1, 40 µg.ml⁻¹ thymine, 20 µg.ml⁻¹ leucine). Le chloramphénicol est utilisé à 200 µg.ml⁻¹.

Test de l'activité de répression

La souche DLT 1127 porte sur son chromosome le gène *lacZ* sous le contrôle du promoteur *psop* (λ RS88-*kan-PsopF* : *lacZ*). Les plasmides dérivés de pAM238 portant *sopA* seul, en absence ou en présence de *sopB* ou des variants de *sopB* sont introduits dans DLT 1127 en absence ou en présence du plasmide pZC204 portant *sopC*. Les cellules sont mises en culture sur la nuit en LB en présence de spectinomycine et ou de chloramphénicol. Le matin, les cultures sont diluées 400 fois dans le même milieu frais et mises en culture jusqu'à DO₆₀₀ = 0,25. Les activités β -galactosidases sont mesurées comme cela est décrit dans ([Lane et al., 1994](#)). Si la protéine SopA testée n'exerce plus sa fonction de répresseur alors l'activité β -galactosidase sera maximale.

Résonance plasmon de surface

Les expériences de SPR sont réalisées comme décrites dans [Ah-Seng et al. 2009](#) à l'exception des sondes d'ADN utilisées qui possèdent soit un site *sopC* (*sopC*), soit le site de fixation de SopA (*pSop*) ou soit une séquence d'ADN non spécifique (NS).

Plasmides	Caractéristiques
pJYB57	pBSKS ⁺ , <i>bla</i> , <i>sopC</i> ⁺
pDAG114	mini-F, <i>cat</i> , <i>pSop</i> : : <i>sopABC</i>
pDAG115	mini-F, <i>cat</i> , <i>pSop</i> : : <i>sopAB</i> Δ <i>sopC</i>
pDAG209	pDAG114, <i>cat</i> , Δ <i>sopAB</i>
pDAG173	mini-F, <i>cat</i> , <i>pL_{tetO-1}</i> : : <i>sopABC</i>
pAM238	pSC101, <i>aadA</i>
pZC204	pACYC184, <i>cat</i> , <i>sopC</i>
pZC20	pSC101, <i>bla</i>
pZC314	pZC20, <i>bla</i> , 43 pb <i>sopC</i>
pYAS1	pTYB1, <i>bla</i> , <i>p_{T7}</i> : : <i>sopB</i> : : <i>Scce Intein</i> : : <i>CBD</i>
pYAS6	pYAS1, <i>bla</i> , <i>p_{T7}</i> : : <i>sopB</i> ^{-G324} : : <i>Scce Intein</i> : : <i>CBD</i>
pYAS8	pYAS6, <i>bla</i> , <i>p_{T7}</i> : : <i>sopB</i> ^{-A183P} : : <i>Scce Intein</i> : : <i>CBD</i>
pYAS10	pYAS6, <i>bla</i> , <i>p_{T7}</i> : : <i>sopB</i> ^{-K191A-R195A} : : <i>Scce Intein</i> : : <i>CBD</i>
pYAS12	pYAS6, <i>bla</i> , <i>p_{T7}</i> : : <i>sopB</i> ^{-R42A} : : <i>Scce Intein</i> : : <i>CBD</i>
pYAS14	pYAS6, <i>bla</i> , <i>p_{T7}</i> : : <i>sopB</i> ^{-R42K} : : <i>Scce Intein</i> : : <i>CBD</i>
pYAS17	pYAS6, <i>bla</i> , <i>p_{T7}</i> : : <i>sopB</i> ^{-A183D-K191A-R195A} : : <i>Scce Intein</i> : : <i>CBD</i>
pYAS26	pDAG114, <i>cat</i> , <i>pSop</i> : : <i>sopAB</i> ^{R42A} <i>C</i>
pYAS29	pDAG173, <i>cat</i> , <i>pL_{tetO-1}</i> : : <i>sopAB</i> ^{R42A} <i>C</i>
pYAS36	pDAG114, <i>cat</i> , <i>pSop</i> : : <i>sopAB</i> ^{R42K} <i>C</i>
pYAS37	pDAG173, <i>cat</i> , <i>pL_{tetO-1}</i> : : <i>sopAB</i> ^{R42K} <i>C</i>
pYAS40	pYAS6, <i>bla</i> , <i>p_{T7}</i> : : <i>sopB</i> ^{-R36A} : : <i>Scce Intein</i> : : <i>CBD</i>
pYAS41	pYAS6, <i>bla</i> , <i>p_{T7}</i> : : <i>sopB</i> ^{-R36K} : : <i>Scce Intein</i> : : <i>CBD</i>
pYAS42	pDAG114, <i>cat</i> , <i>pSop</i> : : <i>sopAB</i> ^{R36A} <i>C</i>
pYAS43	pDAG173, <i>cat</i> , <i>pL_{tetO-1}</i> : : <i>sopAB</i> ^{R36A} <i>C</i>
pYAS44	pDAG114, <i>cat</i> , <i>pSop</i> : : <i>sopAB</i> ^{R36K} <i>C</i>
pYAS45	pDAG173, <i>cat</i> , <i>pL_{tetO-1}</i> : : <i>sopAB</i> ^{R36K} <i>C</i>
pYAS46	pAM238, <i>aadA</i> , <i>p_{lac}</i> : : <i>sopA</i>
pYAS47	pAM238, <i>aadA</i> , <i>p_{lac}</i> : : <i>sopAB</i>
pYAS48	pYAS6, <i>bla</i> , <i>p_{T7}</i> : : <i>sopB</i> ^{-N52} : : <i>Scce Intein</i> : : <i>CBD</i>
pYAS64	pAM238, <i>aadA</i> , <i>p_{lac}</i> : : <i>sopAB</i> ^{R36A}
pYAS65	pAM238, <i>aadA</i> , <i>p_{lac}</i> : : <i>sopAB</i> ^{R36K}
pYAS66	pAM238, <i>aadA</i> , <i>p_{lac}</i> : : <i>sopAB</i> ^{R42A}
pYAS67	pAM238, <i>aadA</i> , <i>p_{lac}</i> : : <i>sopAB</i> ^{R42K}

Tableau 4 – Tableau des plasmides utilisés

Souches	Caractéristiques
DH10B	<i>araD139, Δ(ara-leu)7679, ΔlacX74, galU, galK, rpsL, deoR, endA1, nupG, recA1, mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mrcBC)</i>
MG1655	F ⁻ , λ ⁻ , <i>recF143, pcnB : :kan</i>
DLT1127	<i>araD139, Δ(ara-leu)7679, ΔlacX74, galU, galK, rpsL, thi, hsdR2, mcrB, λRS88-Kan-PsopF : :lacZ</i>
JS238	<i>araD139, Δ(ara-leu)7679, ΔlacX74, galU, galK, rpsL, thi, HsdR2, mcrB, PmalP : :lacI^q, srlC : :TN10, recA1</i>
C2833	<i>F', proA⁺B⁺, lacI^qzzf : :Tn10(Tet^R)/ fhuA2, lacZ : :T7, gene1, [lon], ompT, gal, sulA11, R(mcr-73 : :miniTn10-Tet^S)2, [dcm], R(zgb-210 : :Tn10-Tet^S), endA1, Δ(mcrC-mrr)114 : :IS10</i>

Tableau 5 – **Tableau des souches utilisées**

Noms des oligonucléotides	Séquences
SopB-NdeI _s	GAGATTAGCATATGAAGCGTGCGCCTGTTATTCC (1)
SopB-SapI _a	CTAAAACGCTCTTCAGCAGGGTGCTGGCTTTTCAAGTTCC (1)
SopB-G324 _s	CCAGCACCCGGGTGCTTTGCCAAGGGTACCAATGTTTTAATGGCG (2)
SopB-G324 _a	GCAAAGCACCCGGGTGCTGGCTTTTCAAGTTCCCTTAAGAATGGCC (2)
SopB-A183P _s	TATTTCTGCGCTGCCAGATGCGGAAAATATTTCCAGC (2)
SopB-A183P _a	ATTTTCCGCATCTGGCAGCGCAGAAATATTTCCAGC (2)
SopB-K191A-R195A _s	ATTTCCAGTGCCATTATTACCGCTTGTATCAACACCGCCAAATTG (2)
SopB-K191A-R195A _a	GGTGTGATAACAAGCGGTAATAATGGCAGTGAAATATTTCCGC (2)
SopB-R42A _s	AGGAGTAATGGCTGCCGGTAATGCCATTACTTTGCC (2)
SopB-R42A _a	TAATGGCATTACCGGCAGCCATTACTCCTACGCGCG (2)
SopB-R42K _s	AGGAGTAATGGCTAAGGGTAATGCCATTACTTTGCC (2)
SopB-R42K _a	TAATGGCATTACCCTTAGCCATTACTCCTACGCGCG (2)
SopB-A183D _s	TATTTCTGCGCTGGATGATGCGGAAAATATTTCCAGC (2)
SopB-A183D _a	ATTTTCCGCATCATCCAGCGCAGAAATATTTCCAGC (2)
SopB-R36A _s	GATTCGTTAATTGCGGCCGTAGGAGTAATGGCTCGCG (2)
SopB-R36A _a	AGCCATTACTCCTACGGCCGCAATTAACGAATCCACC (2)
SopB-R36K _s	GATTCGTTAATTGCGAAAGTAGGAGTAATGGCTCGCG (2)
SopB-R36K _a	AGCCATTACTCCTACTTTGCAATTAACGAATCCACC (2)
SopB-282-SapI _a	CTAAAACGCTCTTCAGCAACCACATACAGGCAAAGTAATG (3)
SopA-EcoRI _s	CGCAAAGGAATTCTTAAAGGATGTTTCAGAATGA (4)
SopA-BamHI _a	CTAAAACGGATCCTTATCTAATCTCCCAGCGTG (4)
SopB-HindIII _a	CTAAAACAAGCTTTCAGGGTGCTGGCTTTTCAA (4)
pSopA1	GTATGTGCTCTTCTTATCTCCT(5)
pSopA2	AGTCTTACTTTGAGTACCTTTGT(5)
sopC22	CTAGTGGATCCCCGGGCTGCAG(5)
sopC23	CCCTCACTAAAGGGAACAAAAGC(5)
repE1	AGTTACCAGCGTATGCCTGACTTCC(5)
repE2	ACGATATGAGTCGTCTGGCGGCCTT(5)

Tableau 6 – **Tableau des oligonucléotides utilisés**

(1) Oligonucléotides utilisés pour clonage de *sopB* dans le vecteur pTYB. (2) Oligonucléotides utilisés pour l'introduction des mutations dans *sopB*. (3) Oligonucléotide utilisé pour la construction de *sopB-N52*. (4) Oligonucléotides utilisés pour les clones de SopA et des variants de SopB dans le pAM238 (pSC101). (5) Oligonucléotides utilisés pour la production des sondes d'ADN radiomarquée utilisée pour les expériences de retard sur gel.

Bibliographie

- Abeles, A. L., S. A. Friedman, and S. J. Austin, 1985 : Partition of unit-copy miniplasmids to daughter cells. III. The DNA sequence and functional organization of the P1 partition region . *J Mol Biol*, **185**(2), 261–72.
- Adachi, S., K. Hori, and S. Hiraga, 2006 : Subcellular positioning of F plasmid mediated by dynamic localization of SopA and SopB . *J Mol Biol*, **356**(4), 850–63.
- Ah-Seng, Y., F. Lopez, F. Pasta, D. Lane, and J.-Y. Bouet, 2009 : Dual role of DNA in regulating ATP hydrolysis by the SopA partition protein. *J Biol Chem*, **284**(44), 30067–30075.
- Austin, S. and A. Abeles, 1983a : Partition of unit-copy miniplasmids to daughter cells. I. P1 and F miniplasmids contain discrete, interchangeable sequences sufficient to promote equipartition. *J Mol Biol*, **169**(2), 353–372.
- Austin, S. and A. Abeles, 1983b : Partition of unit-copy miniplasmids to daughter cells. II. The partition region of miniplasmid P1 encodes an essential protein and a centromere-like site at which it acts. *J Mol Biol*, **169**(2), 373–387.
- Austin, S. and K. Nordstrom, 1990 : Partition-mediated incompatibility of bacterial plasmids . *Cell*, **60**(3), 351–4.
- Austin, S. and A. Wierzbicki, 1983 : Two mini-F-encoded proteins are essential for equipartition. *Plasmid*, **10**(1), 73–81.
- Barillà, D., E. Carmelo, and F. Hayes, 2007 : The tail of the ParG DNA segregation protein remodels ParF polymers and enhances ATP hydrolysis via an arginine finger-like motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(6), 1811–1816.
- Barillà, D. and F. Hayes, 2003 : Architecture of the ParF-ParG protein complex involved in prokaryotic DNA segregation. *Mol Microbiol*, **49**(2), 487–99.

- Barillà, D., M. F. Rosenberg, U. Nobbmann, and F. Hayes, 2005 : Bacterial DNA segregation dynamics mediated by the polymerizing protein ParF. *EMBO J*, **24**(7), 1453–1464.
- Bartosik, A. A., K. Lasocki, J. Mierzejewska, C. M. Thomas, and G. Jagura-Burdzy, 2004 : ParB of *Pseudomonas aeruginosa* : interactions with its partner ParA and its target parS and specific effects on bacterial growth. *J Bacteriol*, **186**(20), 6983–6998.
- Bergquist, P. L., R. A. Downard, P. A. Caughey, R. C. Gardner, and H. E. Lane, 1981 : Analysis of mini-F plasmid replication by transposition mutagenesis. *J Bacteriol*, **147**(3), 888–899.
- Biek, D. P. and S. N. Cohen, 1989 : Involvement of integration host factor (IHF) in maintenance of plasmid pSC101 in *Escherichia coli* : mutations in the topA gene allow pSC101 replication in the absence of IHF. *J Bacteriol*, **171**(4), 2066–2074.
- Biek, D. P. and J. Shi, 1994 : A single 43-bp sopC repeat of plasmid mini-F is sufficient to allow assembly of a functional nucleoprotein partition complex . *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(17), 8027–31.
- Biek, D. P. and J. Strings, 1995 : Partition functions of mini-F affect plasmid DNA topology in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **246**(3), 388–400.
- Bigot, S., O. A. Saleh, C. Lesterlin, C. Pages, M. E. Karoui, C. Dennis, M. Grigoriev, J.-F. Allemand, F.-X. Barre, and F. Cornet, 2005 : KOPS : DNA motifs that control *E. coli* chromosome segregation by orienting the FtsK translocase. *EMBO J*, **24**(21), 3770–3780.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao, 1997 : The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, **277**(5331), 1453–1462.
- Blomberg, P., K. Nordström, and E. G. Wagner, 1992 : Replication control of plasmid R1 : RepA synthesis is regulated by CopA RNA through inhibition of leader peptide translation. *EMBO J*, **11**(7), 2675–2683.
- Blomberg, P., E. G. Wagner, and K. Nordström, 1990 : Control of replication of plasmid R1 : the duplex between the antisense RNA, CopA, and its target, CopT, is processed specifically in vivo and in vitro by RNase III. *EMBO J*, **9**(7), 2331–2340.

- Bork, P., C. Sander, and A. Valencia, 1992 : An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(16), 7290–7294.
- Bouet, J. Y., Y. Ah-Seng, N. Benmeradi, and D. Lane, 2007 : Polymerization of SopA partition ATPase : regulation by DNA binding and SopB. *Mol Microbiol*, **63**(2), 468–81.
- Bouet, J. Y. and B. E. Funnell, 1999 : P1 ParA interacts with the P1 partition complex at parS and an ATP-ADP switch controls ParA activities. *Embo J*, **18**(5), 1415–24.
- Bouet, J. Y. and D. Lane, 2009 : Molecular basis of the supercoil deficit induced by the mini-F plasmid partition complex. *J Biol Chem*, **284**(1), 165–73. 0021-9258 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- Bouet, J. Y., K. Nordstrom, and D. Lane, 2007 : Plasmid partition and incompatibility - the focus shifts. *Mol Microbiol*, **65**(6), 1405–14.
- Bouet, J. Y., J. Rech, S. Egloff, D. P. Biek, and D. Lane, 2005 : Probing plasmid partition with centromere-based incompatibility . *Mol Microbiol*, **55**(2), 511–25.
- Bouet, J. Y., J. A. Surtees, and B. E. Funnell, 2000 : Stoichiometry of P1 plasmid partition complexes. *J Biol Chem*, **275**(11), 8213–9.
- Breüner, A., R. B. Jensen, M. Dam, S. Pedersen, and K. Gerdes, 1996 : The centromere-like parC locus of plasmid R1. *Mol Microbiol*, **20**(3), 581–592.
- Britton, R. A., D. C. Lin, and A. D. Grossman, 1998 : Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning. *Genes Dev*, **12**(9), 1254–1259.
- Campbell, C. S. and R. D. Mullins, 2007 : In vivo visualization of type II plasmid segregation : bacterial actin filaments pushing plasmids. *J Cell Biol*, **179**(5), 1059–66.
- Casjens, S., 1998 : The diverse and dynamic structure of bacterial genomes. *Annu Rev Genet*, **32**, 339–377.
- Castaing, J. P., J. Y. Bouet, and D. Lane, 2008 : F plasmid partition depends on interaction of SopA with non-specific DNA. *Mol Microbiol*, **70**(4), 1000–11. 1365-2958 (Electronic) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.

- Chattoraj, D. K., 2000 : Control of plasmid DNA replication by iterons : no longer paradoxical. *Mol Microbiol*, **37**(3), 467–476.
- Chattoraj, D. K., R. J. Mason, and S. H. Wickner, 1988 : Mini-P1 plasmid replication : the autoregulation-sequestration paradox. *Cell*, **52**(4), 551–557.
- Chen, Y. and H. P. Erickson, 2008 : In vitro assembly studies of FtsZ/tubulin-like proteins (TubZ) from Bacillus plasmids : evidence for a capping mechanism. *J Biol Chem*, **283**(13), 8102–8109.
- Choi, C. L., S. A. Claridge, E. C. Garner, A. P. Alivisatos, and R. D. Mullins, 2008 : Protein-nanocrystal conjugates support a single filament polymerization model in R1 plasmid segregation. *J Biol Chem*, **283**(42), 28081–28086.
- Cooper, S. and C. E. Helmstetter, 1968 : Chromosome replication and the division cycle of Escherichia coli B/r. *J Mol Biol*, **31**(3), 519–540.
- Crampton, D. J., S. Guo, D. E. Johnson, and C. C. Richardson, 2004 : The arginine finger of bacteriophage T7 gene 4 helicase : role in energy coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(13), 4373–4378.
- Dam, M. and K. Gerdes, 1994 : Partitioning of plasmid R1. Ten direct repeats flanking the parA promoter constitute a centromere-like partition site parC, that expresses incompatibility. *J Mol Biol*, **236**(5), 1289–1298.
- Danilova, O., R. Reyes-Lamothe, M. Pinskaya, D. Sherratt, and 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**(6), 1485–1492.
- Davey, M. J. and B. E. Funnell, 1994 : The P1 plasmid partition protein ParA. A role for ATP in site-specific DNA binding. *J Biol Chem*, **269**(47), 29908–13.
- Davey, M. J. and B. E. Funnell, 1997 : Modulation of the P1 plasmid partition protein ParA by ATP, ADP, and P1 ParB. *J Biol Chem*, **272**(24), 15286–92.
- Davis, M. A., K. A. Martin, and S. J. Austin, 1990 : Specificity switching of the P1 plasmid centromere-like site. *EMBO J*, **9**(4), 991–998.
- Davis, M. A., K. A. Martin, and S. J. Austin, 1992 : Biochemical activities of the parA partition protein of the P1 plasmid. *Mol Microbiol*, **6**(9), 1141–7.
- Davis, M. A., L. Radnedge, K. A. Martin, F. Hayes, B. Youngren, and S. J. Austin, 1996 : The P1 ParA protein and its ATPase activity play a direct role in the

- segregation of plasmid copies to daughter cells. *Mol Microbiol*, **21**(5), 1029–36. 0950-382X (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- del Solar, G. and M. Espinosa, 2000 : Plasmid copy number control : an ever-growing story. *Mol Microbiol*, **37**(3), 492–500.
- del Solar, G., R. Giraldo, M. J. Ruiz-Echevarría, M. Espinosa, and R. Díaz-Orejas, 1998 : Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**(2), 434–464.
- Dubarry, N., F. Pasta, and D. Lane, 2006 : ParABS systems of the four replicons of *Burkholderia cenocepacia* : new chromosome centromeres confer partition specificity. *J Bacteriol*, **188**(4), 1489–1496.
- Dunham, T. D., W. Xu, B. E. Funnell, and M. A. Schumacher, 2009 : Structural basis for ADP-mediated transcriptional regulation by P1 and P7 ParA. *EMBO J*, **28**(12), 1792–1802.
- Dworkin, J. and R. Losick, 2002 : Does RNA polymerase help drive chromosome segregation in bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(22), 14089–14094.
- Easter, J., J. and J. W. Gober, 2002 : ParB-stimulated nucleotide exchange regulates a switch in functionally distinct ParA activities. *Mol Cell*, **10**(2), 427–34.
- Ebersbach, G. and K. Gerdes, 2001 : The double par locus of virulence factor pB171 : DNA segregation is correlated with oscillation of ParA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(26), 15078–83.
- Ebersbach, G. and K. Gerdes, 2004 : Bacterial mitosis : partitioning protein ParA oscillates in spiral-shaped structures and positions plasmids at mid-cell. *Mol Microbiol*, **52**(2), 385–98.
- Ebersbach, G., S. Ringgaard, J. Moller-Jensen, Q. Wang, D. J. Sherratt, and K. Gerdes, 2006 : Regular cellular distribution of plasmids by oscillating and filament-forming ParA ATPase of plasmid pB171. *Mol Microbiol*, **61**(6), 1428–42. 0950-382X (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- Edgar, R., D. K. Chatteraj, and M. Yarmolinsky, 2001 : Pairing of P1 plasmid partition sites by ParB. *Mol Microbiol*, **42**(5), 1363–1370.
- Erdmann, N., T. Petroff, and B. E. Funnell, 1999 : Intracellular localization of P1 ParB protein depends on ParA and parS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(26), 14905–10.

- Espeli, O., R. Mercier, and F. Boccard, 2008 : DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the *E. coli* chromosome. *Mol Microbiol*, **68**(6), 1418–1427.
- Friedman, S. A. and S. J. Austin, 1988 : The P1 plasmid-partition system synthesizes two essential proteins from an autoregulated operon. *Plasmid*, **19**(2), 103–12. 0147-619X (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- Fung, E., J. Y. Bouet, and B. E. Funnell, 2001 : Probing the ATP-binding site of P1 ParA : partition and repression have different requirements for ATP binding and hydrolysis. *Embo J*, **20**(17), 4901–11.
- Funnell, B. E., 1988 : Participation of Escherichia coli integration host factor in the P1 plasmid partition system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**(18), 6657–61.
- Funnell, B. E., 1991 : The P1 plasmid partition complex at parS. The influence of Escherichia coli integration host factor and of substrate topology. *J Biol Chem*, **266**(22), 14328–37.
- Funnell, B. E. and L. Gagnier, 1993 : The P1 plasmid partition complex at parS. II. Analysis of ParB protein binding activity and specificity. *J Biol Chem*, **268**(5), 3616–24.
- Funnell, B. E. and L. Gagnier, 1994 : P1 plasmid partition : binding of P1 ParB protein and Escherichia coli integration host factor to altered parS sites. *Biochimie*, **76**(10-11), 924–932.
- Gardner, R. C., L. Malcolm, P. L. Bergquist, and H. E. Lane, 1982 : IncD, a genetic locus in F responsible for incompatibility with several plasmids of the IncFI group. *Mol Gen Genet*, **188**(2), 345–352.
- Garner, E. C., C. S. Campbell, and R. D. Mullins, 2004 : Dynamic instability in a DNA-segregating prokaryotic actin homolog. *Science*, **306**(5698), 1021–5. 1095-9203 (Electronic) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- Garner, E. C., C. S. Campbell, D. B. Weibel, and R. D. Mullins, 2007 : Reconstitution of DNA segregation driven by assembly of a prokaryotic actin homolog. *Science*, **315**(5816), 1270–4.
- Gelles, J. and R. Landick, 1998 : RNA polymerase as a molecular motor. *Cell*, **93**(1), 13–16.

- Georgiadis, M. M., H. Komiya, P. Chakrabarti, D. Woo, J. J. Kornuc, and D. C. Rees, 1992 : Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Science*, **257**(5077), 1653–1659.
- Gerdes, K., A. P. Gulyaev, T. Franch, K. Pedersen, and N. D. Mikkelsen, 1997 : Antisense RNA-regulated programmed cell death. *Annu Rev Genet*, **31**, 1–31.
- Gerdes, K., J. Moller-Jensen, and R. Bugge Jensen, 2000 : Plasmid and chromosome partitioning : surprises from phylogeny. *Mol Microbiol*, **37**(3), 455–66.
- Gil, D., 1990 : *Elaboration et caractérisation d'un nouveau type de vecteur de clonage à nombre de copies régulable*. Phd thesis, Université de Paul Sabatier, Toulouse, France.
- Gitai, Z., N. Dye, and L. Shapiro, 2004 : An actin-like gene can determine cell polarity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(23), 8643–8648.
- Godfrin-Estevenon, A. M., F. Pasta, and D. Lane, 2002 : The parAB gene products of *Pseudomonas putida* exhibit partition activity in both *P. putida* and *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **43**(1), 39–49.
- Golovanov, A. P., D. Barillà, M. Golovanova, F. Hayes, and L.-Y. Lian, 2003 : ParG, a protein required for active partition of bacterial plasmids, has a dimeric ribbon-helix-helix structure. *Mol Microbiol*, **50**(4), 1141–1153.
- Gordon, G. S., D. Sitnikov, C. D. Webb, A. Teleman, A. Straight, R. Losick, A. W. Murray, and A. Wright, 1997 : Chromosome and low copy plasmid segregation in *E. coli* : visual evidence for distinct mechanisms. *Cell*, **90**(6), 1113–21.
- Gruber, S. and J. Errington, 2009 : Recruitment of condensin to replication origin regions by ParB/SpoOJ promotes chromosome segregation in *B. subtilis*. *Cell*, **137**(4), 685–696.
- Hanai, R., R. Liu, P. Benedetti, P. R. Caron, A. S. Lynch, and J. C. Wang, 1996 : Molecular dissection of a protein SopB essential for *Escherichia coli* F plasmid partition. *J Biol Chem*, **271**(29), 17469–17475.
- Hao, J.-J. and M. Yarmolinsky, 2002 : Effects of the P1 plasmid centromere on expression of P1 partition genes. *J Bacteriol*, **184**(17), 4857–4867.
- Hatano, T., Y. Yamaichi, and H. Niki, 2007 : Oscillating focus of SopA associated with filamentous structure guides partitioning of F plasmid. *Mol Microbiol*, **64**(5), 1198–213. 0950-382X (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.

- Hayakawa, Y., T. Murotsu, and K. Matsubara, 1985 : Mini-F protein that binds to a unique region for partition of mini-F plasmid DNA. *J Bacteriol*, **163**(1), 349–54. 0021-9193 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- Hayashi, I., T. Oyama, and K. Morikawa, 2001 : Structural and functional studies of MinD ATPase : implications for the molecular recognition of the bacterial cell division apparatus. *EMBO J*, **20**(8), 1819–1828.
- Hayes, F., L. Radnedge, M. A. Davis, and S. J. Austin, 1994 : The homologous operators for P1 and P7 plasmid partition are autoregulated from dissimilar operator sites. *Mol Microbiol*, **11**(2), 249–260.
- Helsberg, M. and R. Eichenlaub, 1986 : Twelve 43-base-pair repeats map in a cis-acting region essential for partition of plasmid mini-F. *J Bacteriol*, **165**(3), 1043–1045.
- Hirano, M. and T. Hirano, 2004 : Positive and negative regulation of SMC-DNA interactions by ATP and accessory proteins. *EMBO J*, **23**(13), 2664–2673.
- Hirano, M., H. Mori, T. Onogi, M. Yamazoe, H. Niki, T. Ogura, and S. Hiraga, 1998 : Autoregulation of the partition genes of the mini-F plasmid and the intracellular localization of their products in Escherichia coli. *Mol Gen Genet*, **257**(4), 392–403.
- Hommals, F., E. Krin, C. Laurent-Winter, O. Soutourina, A. Malpertuy, J. P. L. Caer, A. Danchin, and P. Bertin, 2001 : Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol Microbiol*, **40**(1), 20–36.
- Hu, Z., E. P. Gogol, and J. Lutkenhaus, 2002 : Dynamic assembly of MinD on phospholipid vesicles regulated by ATP and MinE. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(10), 6761–6.
- Hui, M. P., V. E. Galkin, X. Yu, A. Z. Stasiak, A. Stasiak, M. K. Waldor, and E. H. Egelman, 2010 : ParA2, a Vibrio cholerae chromosome partitioning protein, forms left-handed helical filaments on DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**(10), 4590–4595.
- Hunding, A., G. Ebersbach, and K. Gerdes, 2003 : A mechanism for ParB-dependent waves of ParA, a protein related to DNA segregation during cell division in prokaryotes. *J Mol Biol*, **329**(1), 35–43.
- Ireton, K., N. W. t. Gunther, and A. D. Grossman, 1994 : spo0J is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in Bacillus subtilis. *J Bacteriol*, **176**(17), 5320–9.

- Ishiai, M., C. Wada, Y. Kawasaki, and T. Yura, 1994 : Replication initiator protein RepE of mini-F plasmid : functional differentiation between monomers (initiator) and dimers (autogenous repressor). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(9), 3839–3843.
- Jacob, F. and S. Brenner, 1963 : On the regulation of DNA synthesis in bacteria : the hypothesis of the replicon. *C R Hebd Seances Acad Sci*, **256**, 298–300.
- Jakimowicz, D., K. Chater, and J. Zakrzewska-Czerwínska, 2002 : The ParB protein of *Streptomyces coelicolor* A3(2) recognizes a cluster of parS sequences within the origin-proximal region of the linear chromosome. *Mol Microbiol*, **45**(5), 1365–1377.
- Jakimowicz, D., S. Mouz, J. Zakrzewska-Czerwinska, and K. F. Chater, 2006 : Developmental control of a parAB promoter leads to formation of sporulation-associated ParB complexes in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, **188**(5), 1710–1720.
- James, J. A., C. R. Escalante, M. Yoon-Robarts, T. A. Edwards, R. M. Linden, and A. K. Aggarwal, 2003 : Crystal structure of the SF3 helicase from adeno-associated virus type 2. *Structure*, **11**(8), 1025–1035.
- Jang, S. B., L. C. Seefeldt, and J. W. Peters, 2000 : Insights into nucleotide signal transduction in nitrogenase : structure of an iron protein with MgADP bound. *Biochemistry*, **39**(48), 14745–14752.
- Jensen, R. B. and K. Gerdes, 1997 : Partitioning of plasmid R1. The ParM protein exhibits ATPase activity and interacts with the centromere-like ParR-parC complex. *J Mol Biol*, **269**(4), 505–513.
- Jensen, R. B. and K. Gerdes, 1999 : Mechanism of DNA segregation in prokaryotes : ParM partitioning protein of plasmid R1 co-localizes with its replicon during the cell cycle. *EMBO J*, **18**(14), 4076–4084.
- Jensen, R. B., R. Lurz, and K. Gerdes, 1998 : Mechanism of DNA segregation in prokaryotes : replicon pairing by parC of plasmid R1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(15), 8550–5.
- Jones, L. J., R. Carballido-López, and J. Errington, 2001 : Control of cell shape in bacteria : helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell*, **104**(6), 913–922.
- Kim, H. J., M. J. Calcutt, F. J. Schmidt, and K. F. Chater, 2000 : Partitioning of the linear chromosome during sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves an oriC-linked parAB locus. *J Bacteriol*, **182**(5), 1313–20.

- Kline, B. C., 1979 : Incompatibility between Flac, R386, and F :pSC101 recombinant plasmids : the specificity of F incompatibility genes. *Plasmid*, **2**(3), 437–445.
- Koonin, E. V., 1993 : A superfamily of ATPases with diverse functions containing either classical or deviant ATP-binding motif. *J Mol Biol*, **229**(4), 1165–1174.
- Kruse, T., B. Blagoev, A. Løbner-Olesen, M. Wachi, K. Sasaki, N. Iwai, M. Mann, and K. Gerdes, 2006 : Actin homolog MreB and RNA polymerase interact and are both required for chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, **20**(1), 113–124.
- Kruse, T., J. Møller-Jensen, A. Løbner-Olesen, and K. Gerdes, 2003 : Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*. *EMBO J*, **22**(19), 5283–5292.
- Lane, D., J. Cavaillé, and M. Chandler, 1994 : Induction of the SOS response by IS1 transposase. *J Mol Biol*, **242**(4), 339–350.
- Larsen, R. A., C. Cusumano, A. Fujioka, G. Lim-Fong, P. Patterson, and J. Pogliano, 2007 : Treadmilling of a prokaryotic tubulin-like protein, TubZ, required for plasmid stability in *Bacillus thuringiensis*. *Genes Dev*, **21**(11), 1340–52. 0890-9369 (Print) Comparative Study Journal Article Research Support, N.I.H., Extramural.
- Lee, M.-J., C.-H. Liu, S.-Y. Wang, C.-T. Huang, and H. Huang, 2006 : Characterization of the Soj/Spo0J chromosome segregation proteins and identification of putative parS sequences in *Helicobacter pylori*. *Biochem Biophys Res Commun*, **342**(3), 744–750.
- Lee, P. S. and A. D. Grossman, 2006 : The chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB) contribute to accurate chromosome partitioning, separation of replicated sister origins, and regulation of replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **60**(4), 853–869.
- Lemon, K. P. and A. D. Grossman, 1998 : Localization of bacterial DNA polymerase : evidence for a factory model of replication. *Science*, **282**(5393), 1516–1519.
- Lemonnier, M., J. Y. Bouet, V. Libante, and D. Lane, 2000 : Disruption of the F plasmid partition complex in vivo by partition protein SopA. *Mol Microbiol*, **38**(3), 493–505.
- Leonard, T. A., P. J. Butler, and J. Lowe, 2005 : Bacterial chromosome segregation : structure and DNA binding of the Soj dimer—a conserved biological switch. *Embo J*, **24**(2), 270–82.

- Lesterlin, C., F.-X. Barre, and F. Cornet, 2004 : Genetic recombination and the cell cycle : what we have learned from chromosome dimers. *Mol Microbiol*, **54**(5), 1151–1160.
- Lewis, R. A., C. R. Bignell, W. Zeng, A. C. Jones, and C. M. Thomas, 2002 : Chromosome loss from par mutants of *Pseudomonas putida* depends on growth medium and phase of growth. *Microbiology*, **148**(Pt 2), 537–48.
- Li, Y., A. Dabrazhynetskaya, B. Youngren, and S. Austin, 2004 : The role of Par proteins in the active segregation of the P1 plasmid. *Mol Microbiol*, **53**(1), 93–102.
- Li, Y., K. Sergueev, and S. Austin, 2002 : The segregation of the *Escherichia coli* origin and terminus of replication. *Mol Microbiol*, **46**(4), 985–996.
- Libante, V., L. Thion, and D. Lane, 2001 : Role of the ATP-binding site of SopA protein in partition of the F plasmid. *J Mol Biol*, **314**(3), 387–99.
- Lim, G. E., A. I. Derman, and J. Pogliano, 2005 : Bacterial DNA segregation by dynamic SopA polymers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(49), 17658–63.
- Lin, D. C. and A. D. Grossman, 1998 : Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site. *Cell*, **92**(5), 675–85.
- Lin, D. C., P. A. Levin, and A. D. Grossman, 1997 : Bipolar localization of a chromosome partition protein in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(9), 4721–4726.
- Lobocka, M. and M. Yarmolinsky, 1996 : P1 plasmid partition : a mutational analysis of ParB. *J Mol Biol*, **259**(3), 366–382.
- Lobry, J. R. and J.-M. Louarn, 2003 : Polarisation of prokaryotic chromosomes. *Curr Opin Microbiol*, **6**(2), 101–108.
- Lutz, R. and H. Bujard, 1997 : Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res*, **25**(6), 1203–1210.
- Lynch, A. S. and J. C. Wang, 1994 : Use of an inducible site-specific recombinase to probe the structure of protein-DNA complexes involved in F plasmid partition in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **236**(3), 679–84.
- Lynch, A. S. and J. C. Wang, 1995 : SopB protein-mediated silencing of genes linked to the sopC locus of *Escherichia coli* F plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(6), 1896–1900.

- Marston, A. L. and J. Errington, 1999 : Dynamic movement of the ParA-like Soj protein of *B. subtilis* and its dual role in nucleoid organization and developmental regulation. *Mol Cell*, **4**(5), 673–82.
- Martin, K. A., S. A. Friedman, and S. J. Austin, 1987 : Partition site of the P1 plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**(23), 8544–8547.
- Mascarenhas, J., J. Soppa, A. V. Strunnikov, and P. L. Graumann, 2002 : Cell cycle-dependent localization of two novel prokaryotic chromosome segregation and condensation proteins in *Bacillus subtilis* that interact with SMC protein. *EMBO J*, **21**(12), 3108–3118.
- McEachern, M. J., M. A. Bott, P. A. Tooker, and D. R. Helinski, 1989 : Negative control of plasmid R6K replication : possible role of intermolecular coupling of replication origins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**(20), 7942–7946.
- Meinhardt, H. and P. A. de Boer, 2001 : Pattern formation in *Escherichia coli* : a model for the pole-to-pole oscillations of Min proteins and the localization of the division site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(25), 14202–14207.
- Mercier, R., M.-A. Petit, S. Schbath, S. Robin, M. E. Karoui, F. Boccard, and O. Espéli, 2008 : The MatP/matS site-specific system organizes the terminus region of the *E. coli* chromosome into a macrodomain. *Cell*, **135**(3), 475–485.
- Mohl, D. A., J. Easter, and J. W. Gober, 2001 : The chromosome partitioning protein, ParB, is required for cytokinesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*, **42**(3), 741–755.
- Mohl, D. A. and J. W. Gober, 1997 : Cell cycle-dependent polar localization of chromosome partitioning proteins in *Caulobacter crescentus*. *Cell*, **88**(5), 675–684.
- Moller-Jensen, J., J. Borch, M. Dam, R. B. Jensen, P. Roepstorff, and K. Gerdes, 2003 : Bacterial mitosis : ParM of plasmid R1 moves plasmid DNA by an actin-like insertional polymerization mechanism. *Mol Cell*, **12**(6), 1477–87.
- Moller-Jensen, J., R. B. Jensen, J. Lowe, and K. Gerdes, 2002 : Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament. *Embo J*, **21**(12), 3119–27.
- Moller-Jensen, J., S. Ringgaard, C. P. Mercogliano, K. Gerdes, and J. Lowe, 2007 : Structural analysis of the ParR/parC plasmid partition complex. *Embo J*.

- Mori, H., A. Kondo, A. Ohshima, T. Ogura, and S. Hiraga, 1986 : Structure and function of the F plasmid genes essential for partitioning. *J Mol Biol*, **192**(1), 1–15.
- Mori, H., Y. Mori, C. Ichinose, H. Niki, T. Ogura, A. Kato, and S. Hiraga, 1989 : Purification and characterization of SopA and SopB proteins essential for F plasmid partitioning. *J Biol Chem*, **264**(26), 15535–41.
- Morrison, P. F. and D. K. Chattoraj, 2004 : Replication of a unit-copy plasmid F in the bacterial cell cycle : a replication rate function analysis. *Plasmid*, **52**(1), 13–30.
- Motallebi-Veshareh, M., D. A. Rouch, and C. M. Thomas, 1990 : A family of ATPases involved in active partitioning of diverse bacterial plasmids. *Mol Microbiol*, **4**(9), 1455–63.
- Murray, H. and J. Errington, 2008 : Dynamic control of the DNA replication initiation protein DnaA by Soj/ParA. *Cell*, **135**(1), 74–84.
- Murray, H., H. Ferreira, and J. Errington, 2006 : The bacterial chromosome segregation protein Spo0J spreads along DNA from parS nucleation sites. *Mol Microbiol*, **61**(5), 1352–1361.
- Nadanaciva, S., J. Weber, S. Wilke-Mounts, and A. E. Senior, 1999 : Importance of F1-ATPase residue alpha-Arg-376 for catalytic transition state stabilization. *Biochemistry*, **38**(47), 15493–9.
- Nasmyth, K. and C. H. Haering, 2005 : The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu Rev Biochem*, **74**, 595–648.
- Niedenzu, T., D. Röleke, G. Bains, E. Scherzinger, and W. Saenger, 2001 : Crystal structure of the hexameric replicative helicase RepA of plasmid RSF1010. *J Mol Biol*, **306**(3), 479–487.
- Niki, H. and S. Hiraga, 1997 : Subcellular distribution of actively partitioning F plasmid during the cell division cycle in *E. coli*. *Cell*, **90**(5), 951–7.
- Niki, H. and S. Hiraga, 1998 : Polar localization of the replication origin and terminus in *Escherichia coli* nucleoids during chromosome partitioning. *Genes Dev*, **12**(7), 1036–45.
- Niki, H., R. Imamura, M. Kitaoka, K. Yamanaka, T. Ogura, and S. Hiraga, 1992 : *E. coli* MukB protein involved in chromosome partition forms a homodimer with a

- rod-and-hinge structure having DNA binding and ATP/GTP binding activities. *EMBO J*, **11**(13), 5101–5109.
- Niki, H., Y. Yamaichi, and S. Hiraga, 2000 : Dynamic organization of chromosomal DNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, **14**(2), 212–223.
- Nordström, K., 2006 : Plasmid R1–replication and its control. *Plasmid*, **55**(1), 1–26.
- Nordström, K., S. Molin, and J. Light, 1984 : Control of replication of bacterial plasmids : genetics, molecular biology, and physiology of the plasmid R1 system. *Plasmid*, **12**(2), 71–90.
- Ogura, T. and S. Hiraga, 1983 : Partition mechanism of F plasmid : two plasmid gene-encoded products and a cis-acting region are involved in partition. *Cell*, **32**(2), 351–60.
- Ogura, T., T. Miki, and S. Hiraga, 1980 : Copy-number mutants of the plasmid carrying the replication origin of the *Escherichia coli* chromosome : evidence for a control region of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**(7), 3993–3997.
- Orlova, A., E. C. Garner, V. E. Galkin, J. Heuser, R. D. Mullins, and E. H. Egelman, 2007 : The structure of bacterial ParM filaments. *Nat Struct Mol Biol*, **14**(10), 921–6.
- Pal, S. K. and D. K. Chattoraj, 1988 : P1 plasmid replication : initiator sequestration is inadequate to explain control by initiator-binding sites. *J Bacteriol*, **170**(8), 3554–3560.
- Popp, D., A. Narita, T. Oda, T. Fujisawa, H. Matsuo, Y. Nitanaï, M. Iwasa, K. Maeda, H. Onishi, and Y. Maéda, 2008 : Molecular structure of the ParM polymer and the mechanism leading to its nucleotide-driven dynamic instability. *EMBO J*, **27**(3), 570–579.
- Pratto, F., A. Cicek, W. A. Weihofen, R. Lurz, W. Saenger, and J. C. Alonso, 2008 : *Streptococcus pyogenes* pSM19035 requires dynamic assembly of ATP-bound ParA and ParB on parS DNA during plasmid segregation. *Nucleic Acids Res*, **36**(11), 3676–89. 1362-4962 (Electronic) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- Putnam, C. D., S. B. Clancy, H. Tsuruta, S. Gonzalez, J. G. Wetmur, and J. A. Tainer, 2001 : Structure and mechanism of the RuvB Holliday junction branch migration motor. *J Mol Biol*, **311**(2), 297–310.

- Quisel, J. D. and A. D. Grossman, 2000 : Control of sporulation gene expression in *Bacillus subtilis* by the chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB) . *J Bacteriol*, **182**(12), 3446–51.
- Quisel, J. D., D. C. Lin, and A. D. Grossman, 1999 : Control of development by altered localization of a transcription factor in *B. subtilis*. *Mol Cell*, **4**(5), 665–72.
- Ravin, N. and D. Lane, 1999 : Partition of the linear plasmid N15 : interactions of N15 partition functions with the *sop* locus of the F plasmid. *J Bacteriol*, **181**(22), 6898–6906.
- Ravin, N. V., J. Rech, and D. Lane, 2003 : Mapping of functional domains in F plasmid partition proteins reveals a bipartite SopB-recognition domain in SopA. *J Mol Biol*, **329**(5), 875–89.
- Rice, P. A., S. Yang, K. Mizuuchi, and H. A. Nash, 1996 : Crystal structure of an IHF-DNA complex : a protein-induced DNA U-turn. *Cell*, **87**(7), 1295–1306.
- Ringgaard, S., J. van Zon, M. Howard, and K. Gerdes, 2009 : Movement and equi-positioning of plasmids by ParA filament disassembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**(46), 19369–19374.
- Rittinger, K., P. A. Walker, J. F. Eccleston, K. Nurmahomed, D. Owen, E. Laue, S. J. Gamblin, and S. J. Smerdon, 1997 : Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP. *Nature*, **388**(6643), 693–697.
- Rittinger, K., P. A. Walker, J. F. Eccleston, S. J. Smerdon, and S. J. Gamblin, 1997 : Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature*, **389**(6652), 758–762.
- Rocha, E. P. C., 2008 : The organization of the bacterial genome. *Annu Rev Genet*, **42**, 211–233.
- Rodionov, O., M. Lobočka, and M. Yarmolinsky, 1999 : Silencing of genes flanking the P1 plasmid centromere. *Science*, **283**(5401), 546–549.
- Rodionov, O. and M. Yarmolinsky, 2004 : Plasmid partitioning and the spreading of P1 partition protein ParB. *Mol Microbiol*, **52**(4), 1215–1223.
- Sakai, N., M. Yao, H. Itou, N. Watanabe, F. Yumoto, M. Tanokura, and I. Tanaka, 2001 : The three-dimensional structure of septum site-determining protein MinD from *Pyrococcus horikoshii* OT3 in complex with Mg-ADP. *Structure*, **9**(9), 817–826.

- Salje, J. and J. Löwe, 2008 : Bacterial actin : architecture of the ParMRC plasmid DNA partitioning complex. *EMBO J*, **27**(16), 2230–2238.
- Salje, J., B. Zuber, and J. Löwe, 2009 : Electron cryomicroscopy of *E. coli* reveals filament bundles involved in plasmid DNA segregation. *Science*, **323**(5913), 509–512.
- Salzberg, S. L., A. J. Salzberg, A. R. Kerlavage, and J. F. Tomb, 1998 : Skewed oligomers and origins of replication. *Gene*, **217**(1-2), 57–67.
- Sawaya, M. R., S. Guo, S. Tabor, C. C. Richardson, and T. Ellenberger, 1999 : Crystal structure of the helicase domain from the replicative helicase-primase of bacteriophage T7. *Cell*, **99**(2), 167–177.
- Scheffzek, K., M. R. Ahmadian, W. Kabsch, L. Wiesmüller, A. Lautwein, F. Schmitz, and A. Wittinghofer, 1997 : The Ras-RasGAP complex : structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*, **277**(5324), 333–338.
- Scheffzek, K., M. R. Ahmadian, and A. Wittinghofer, 1998 : GTPase-activating proteins : helping hands to complement an active site. *Trends Biochem Sci*, **23**(7), 257–62. 0968-0004 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Review.
- Schindelin, H., C. Kisker, J. L. Schlessman, J. B. Howard, and D. C. Rees, 1997 : Structure of ADP x AIF4(-)-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. *Nature*, **387**(6631), 370–376.
- Schirner, K. and J. Errington, 2009 : Influence of heterologous MreB proteins on cell morphology of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, **155**(Pt 11), 3611–3621.
- Schumacher, M. A., 2007 : Structural biology of plasmid segregation proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **17**(1), 103–109.
- Schumacher, M. A., 2008 : Structural biology of plasmid partition : uncovering the molecular mechanisms of DNA segregation. *Biochem J*, **412**(1), 1–18.
- Schumacher, M. A. and B. E. Funnell, 2005 : Structures of ParB bound to DNA reveal mechanism of partition complex formation. *Nature*, **438**(7067), 516–9.
- Schumacher, M. A., T. C. Glover, A. J. Brzoska, S. O. Jensen, T. D. Dunham, R. A. Skurray, and N. Firth, 2007 : Segrosome structure revealed by a complex of ParR with centromere DNA. *Nature*, **450**(7173), 1268–1271.

- Schumacher, M. A., K. M. Piro, and W. Xu, 2010 : Insight into F plasmid DNA segregation revealed by structures of SopB and SopB-DNA complexes. *Nucleic Acids Res.*
- Shih, Y.-L., I. Kawagishi, and L. Rothfield, 2005 : The MreB and Min cytoskeletal-like systems play independent roles in prokaryotic polar differentiation. *Mol Microbiol*, **58**(4), 917–928.
- Skarstad, K., E. Boye, and H. B. Steen, 1986 : Timing of initiation of chromosome replication in individual *Escherichia coli* cells. *EMBO J*, **5**(7), 1711–1717.
- Soufo, H. J. D. and P. L. Graumann, 2003 : Actin-like proteins MreB and Mbl from *Bacillus subtilis* are required for bipolar positioning of replication origins. *Curr Biol*, **13**(21), 1916–1920.
- Soultanas, P., M. S. Dillingham, S. S. Velankar, and D. B. Wigley, 1999 : DNA binding mediates conformational changes and metal ion coordination in the active site of PcrA helicase. *J Mol Biol*, **290**(1), 137–148.
- Sternberg, N. and D. Hamilton, 1981 : Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol*, **150**(4), 467–486.
- Suefuji, K., R. Valluzzi, and D. RayChaudhuri, 2002 : Dynamic assembly of MinD into filament bundles modulated by ATP, phospholipids, and MinE. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(26), 16776–16781.
- Sullivan, N. L., K. A. Marquis, and D. Z. Rudner, 2009 : Recruitment of SMC by ParB-parS organizes the origin region and promotes efficient chromosome segregation. *Cell*, **137**(4), 697–707.
- Summers, D. K., C. W. Beton, and H. L. Withers, 1993 : Multicopy plasmid instability : the dimer catastrophe hypothesis. *Mol Microbiol*, **8**(6), 1031–1038.
- Summers, D. K. and D. J. Sherratt, 1984 : Multimerization of high copy number plasmids causes instability : CoIE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell*, **36**(4), 1097–1103.
- Tang, M., D. K. Bideshi, H. W. Park, and B. A. Federici, 2006 : Minireplicon from pBtoxis of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl Environ Microbiol*, **72**(11), 6948–54. 0099-2240 (Print) Evaluation Studies Journal Article Research Support, N.I.H., Extramural.
- Thanbichler, M., S. C. Wang, and L. Shapiro, 2005 : The bacterial nucleoid : a highly organized and dynamic structure. *J Cell Biochem*, **96**(3), 506–521.

- Tolun, A. and D. R. Helinski, 1981 : Direct repeats of the F plasmid incC region express F incompatibility. *Cell*, **24**(3), 687–694.
- Tsutsui, H., A. Fujiyama, T. Murotsu, and K. Matsubara, 1983 : Role of nine repeating sequences of the mini-F genome for expression of F-specific incompatibility phenotype and copy number control. *J Bacteriol*, **155**(1), 337–344.
- Uga, H., F. Matsunaga, and C. Wada, 1999 : Regulation of DNA replication by iterons : an interaction between the ori2 and incC regions mediated by RepE-bound iterons inhibits DNA replication of mini-F plasmid in Escherichia coli. *EMBO J*, **18**(13), 3856–3867.
- Valens, M., S. Penaud, M. Rossignol, F. Cornet, and F. Boccard, 2004 : Macrodomain organization of the Escherichia coli chromosome. *EMBO J*, **23**(21), 4330–4341.
- Van Den Ent, F., J. Moller-Jensen, L. A. Amos, K. Gerdes, and J. Lowe, 2002 : F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. *Embo J*, **21**(24), 6935–43. 0261-4189 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- Viollier, P. H., M. Thanbichler, P. T. McGrath, L. West, M. Meewan, H. H. McAdams, and L. Shapiro, 2004 : Rapid and sequential movement of individual chromosomal loci to specific subcellular locations during bacterial DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(25), 9257–9262.
- Wagner, E. G. and R. W. Simons, 1994 : Antisense RNA control in bacteria, phages, and plasmids. *Annu Rev Microbiol*, **48**, 713–742.
- Wagner, J. K., C. D. Galvani, and Y. V. Brun, 2005 : Caulobacter crescentus requires RodA and MreB for stalk synthesis and prevention of ectopic pole formation. *J Bacteriol*, **187**(2), 544–553.
- Wagner, R., 2000 : Lessons from a manifold regulated system. Transcription Regulation in Prokaryotes. *Oxford : Oxford University Press* 309–330.
- Wang, J. C., 2002 : Cellular roles of DNA topoisomerases : a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**(6), 430–440.
- Wang, M. D., M. J. Schnitzer, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block, 1998 : Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase. *Science*, **282**(5390), 902–907.

- Wang, X., C. Possoz, and D. J. Sherratt, 2005 : Dancing around the divisome : asymmetric chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, **19**(19), 2367–2377.
- Watanabe, E., M. Wachi, M. Yamasaki, and K. Nagai, 1992 : ATPase activity of SopA, a protein essential for active partitioning of F plasmid. *Mol Gen Genet*, **234**(3), 346–52.
- Webb, C. D., P. L. Graumann, J. A. Kahana, A. A. Teleman, P. A. Silver, and R. Losick, 1998 : Use of time-lapse microscopy to visualize rapid movement of the replication origin region of the chromosome during the cell cycle in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **28**(5), 883–92.
- Webb, C. D., A. Teleman, S. Gordon, A. Straight, A. Belmont, D. C. Lin, A. D. Grossman, A. Wright, and R. Losick, 1997 : Bipolar localization of the replication origin regions of chromosomes in vegetative and sporulating cells of *B. subtilis*. *Cell*, **88**(5), 667–74.
- Woldringh, C. L., 2002 : The role of co-transcriptional translation and protein translocation (transertion) in bacterial chromosome segregation. *Mol Microbiol*, **45**(1), 17–29.
- Yamaichi, Y. and H. Niki, 2000 : Active segregation by the *Bacillus subtilis* partitioning system in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(26), 14656–61.
- Yamaichi, Y. and H. Niki, 2004 : migS, a cis-acting site that affects bipolar positioning of oriC on the *Escherichia coli* chromosome. *EMBO J*, **23**(1), 221–233.
- Yates, P., D. Lane, and D. P. Biek, 1999 : The F plasmid centromere, sopC, is required for full repression of the sopAB operon. *J Mol Biol*, **290**(3), 627–38.
- Zhou, T., S. Radaev, B. P. Rosen, and D. L. Gatti, 2000 : Structure of the ArsA ATPase : the catalytic subunit of a heavy metal resistance pump. *EMBO J*, **19**(17), 4838–4845.
- Zimmerman, S. B., 2006 : Shape and compaction of *Escherichia coli* nucleoids. *J Struct Biol*, **156**(2), 255–261.

