



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 Moléculaires

Présentée et soutenue par *Sophie NOLIVOS*

Le 17 septembre 2010

Titre : *Etude du mécanisme de résolution des dimères de chromosomes chez les Streptocoques*

JURY

Pr. P. RITZENTHALER, Professeur, U.P.S, Toulouse

Dr. F.X. BARRE, Directeur de Recherche, C.G.M, Gif-sur-Yvette

Dr. M. ANSALDI, Chargée de Recherche, L.C.B, Marseille

Pr. B. HALLET, Professeur, U.C.L, Louvain-la-Neuve

Dr. M. NOLLMANN, Chargé de Recherche, C.B.S, Montpellier

Dr. F. CORNET, Directeur de recherche, L.M.G.M, Toulouse

Dr. P. LE BOURGEOIS, Maître de Conférence, L.M.G.M, Toulouse

Ecole doctorale : *Biologie-Santé-Biotechnologies, Toulouse*

Unité de recherche : *Laboratoire de Microbiologie et génétique moléculaires, UMR5100 CNRS-UPS*

Directeur(s) de Thèse : *Dr. F. CORNET et Dr P. LE BOURGEOIS, L.M.G.M, Toulouse*

Rapporteurs : *Dr. F.X. BARRE, Directeur de Recherche, CNRS, Gif-sur-Yvette*

Dr. M. ANSALDI, Chargée de Recherche, CNRS, Marseille

MERCI !

Je voudrais remercier tous les membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Je les remercie pour la lecture du manuscrit ainsi que pour leur présence le jour de la soutenance.

Mes plus sincères remerciements vont à mes deux mi-chef, François et Pascal. Je vous remercie de m'avoir fait confiance pour initier ce projet. Chacun à votre manière vous m'avez énormément apporté que ce soit scientifiquement parlant tout comme personnellement. Je vous remercie pour cet encadrement qui m'a laissé beaucoup de liberté tout en me guidant sur la direction à prendre. Je voudrais également vous remercier pour la patience dont vous savez faire preuve, j'ai conscience que ça n'a pas toujours été facile... Pour finir je voudrais que vous sachiez que ce fut un réel plaisir pour moi de travailler sous votre direction. Donc un grand MERCI à tout les deux,

Un grand MERCI également à tous les membres passés et présents de chacune des équipes respectives, qui ont supportés mes humeurs matinales (entre-autres !) à la paillasse ou à la pause café. En particulier Carine, JC, Marie et Philou pour l'équipe des Bisounours. Tout est résumé dans ce nom, c'était un bonheur de travailler avec vous. Je rajoute à la liste Mimi et Couitchies (peu importe l'orthographe) pour vous remercier des discussions scientifiques comme de tous les moments passés extra-labo, que ce soit pour des activités, des soirées, des repas ou juste une pause. Enorméments de souvenirs qui n'ont fait que rendre meilleures ces quatre années de thèse.

Je voudrais également remercier les équipes de Mike Chandler et d'A.G. Carpousis qui m'ont accueillies avant la thèse, et tout particulièrement Béa et Philou (ce n'est pas de trop que de te remercier deux fois !) qui ont joué un rôle primordial dans ma décision d'entreprendre une thèse.

Après quasiment 6 années passées au LMGM, il m'apparaît difficile de remercier individuellement toutes les personnes qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à ce travail. Allant d'un sourire à des discussions scientifiques mes remerciements s'adressent donc à tout un laboratoire.

Je voudrais bien sûr remercier mes parents pour leur soutien. Vous m'avez toujours encouragée pour continuer mes études... ce qui fait que je n'ai pas su m'arrêter ! Je remercie également tous les membres de ma famille. Merci d'avoir été présents physiquement ou par la pensée en ce jour important qu'est la soutenance. Je vous remercie aussi pour l'animation, le lancé de bérets, les chants et surtout pour l'interprétation que vous avez faite de mes travaux,

Pour finir je voudrais remercier mes amis qui m'ont accompagnée depuis le lycée, la Fac, le M2, ou que j'ai rencontrés au cours de la thèse. Je vous remercie entre autres pour tous les moments de détente, d'amusement ou de folie. Un grand merci notamment à The John, Marie et Matthias, Madame copine, les amis collègues que j'ai cités plus haut, Gaëlle, Vaness, et bien sûr Alan. Je voudrais également noter ici quelques lieux toulousains inoubliables sans lesquels il n'y aurait pas eu les moments de détente, d'amusement et de folie qui sont nécessaires dans la vie d'un thésard, comme le Dub, l'Oxford, l'Opus, chez les Gadaux, et surtout les fameuses marches de l'IBCG !

*À mon père,
À ma mère,
À ma sœur,*

SOMMAIRE

I- INTRODUCTION.....	4
I. LA RECOMBINAISON SPECIFIQUE DE SITE	4
II. LES RECOMBINASES A TYROSINE	6
1. Généralités	6
1.1. Les systèmes modèles	6
1.2. Les sites de recombinaison	7
1.3. Organisation des recombinaises à tyrosine	8
1.4. Structure du domaine catalytique.....	9
2. La réaction de recombinaison.....	10
2.1. Fixation des protéines au site de recombinaison	10
2.2. Le complexe synaptique	11
2.3 La réaction de coupure.....	12
2.4. La réaction d'échange de brins	13
2.5. Isomérisation et résolution de la jonction de Holliday.....	14
3. Les mécanismes réactionnels alternatifs.....	16
3.1 Intégration du phage CTX Φ	16
3.2 La capture de cassettes de gènes par les intégrons.....	17
3.3 Les transposons conjugatifs	19
III. LE SYSTEME XER D'E. COLI	21
1. Les recombinaises et leurs sites	21
2. La résolution des dimères de plasmide	22
3. La résolution des dimères de chromosome	24
3.1. La ségrégation des chromosomes et FtsK.....	24
3.1.1 Les liens d'intercaténation	24
3.1.2 Les dimères de chromosome	25
3.2 FtsK couple division et ségrégation	26
3.3 Structures et fonctions du domaine carboxy-terminal de FtsK	27
3.4 FtsK est orientée par les KOPS.....	29
3.4.1 Les KOPS, des motifs biaisés sur le chromosome	29
3.4.2 Mode de reconnaissance des KOPS par FtsK	30
3.4.3 Mode d'action des KOPS sur l'orientation de la translocation	31
3.5 Un contrôle de FtsK dans le temps et l'espace	32
3.6 FtsK, XerCD- <i>dif</i> et la décaténation des chromosomes	34
3.7 FtsK, XerCD- <i>dif</i> et la résolution des dimères de chromosomes	34
3.7.1 La formation de la synapse de recombinaison	34
3.7.2 L'activation de la réaction de recombinaison.....	35
IV. LA CONSERVATION D'UN SYSTEME XER CHEZ LES BACTERIES	38
1. Les recombinaises Xer et le site <i>dif</i>.....	38
2. Le contrôle par la protéine FtsK	39
3. Le système Xer chez les Streptocoques	41
II- RESULTATS.....	43
I. MISE EN PLACE DES OUTILS.....	43
1. Conditions d'expression et de purification de XerS	44
2. Purification de la protéine FtsK_{SL}.....	45
3. Utilisation des sous-domaines γ de FtsK de <i>L. lactis</i> et d'<i>E. coli</i>.....	46
II. ETUDE DU SYSTEME XERS/DIF_{SL} DE <i>L. LACTIS</i>.....	48
1. Présentation de l'article	48
1.1- Introduction	48
1.2- Conclusions	48
1.3- Article.....	49
2. Résultats complémentaires	50

2.1- Définition de la longueur du site <i>dif_{SL}</i>	50
2.2- Définition de la région centrale	51
2.3- Etude de l'asymétrie des bras de fixation du site <i>dif_{SL}</i>	52
2.3.1- XerS se fixe de manière coopérative sur un site symétrique.....	53
2.3.2- L'asymétrie des bras de fixation est nécessaire à la résolution de la jonction de Holliday	55
2.3.3- L'asymétrie des bras de fixation du site <i>dif_{SL}</i> est attribuée à 5 paires de bases	56
2.4- Conclusion.....	57
III. RECHERCHE DES MOTIFS ORIENTANT LA TRANSLOCATION DE FTSK_{SL}	58
1. Introduction	58
2. Résultats	59
2.1- Utilisation d'une protéine chimérique	59
2.2- Les protéines 3γ d' <i>E. coli</i> se fixent efficacement sur des KOPS chevauchants.....	60
2.3- La protéine 3γ de <i>L. lactis</i> ne reconnaît pas les AIMS	61
2.4- Recherche de mots de 8 lettres biaisés et fréquents dans la région autour de <i>dif_{SL}</i>	62
2.5- Reconnaissance d'un seul motif par la protéine 3γ.....	63
2.6- Le domaine γ de <i>L. lactis</i> reconnaît un motif de 7 lettres	64
2.7- Validation du motif par des test de translocation <i>in vivo</i>	65
3. Conclusions	66
III- DISCUSSION GENERALE	68
I. LES SYSTEMES XER ATYPIQUES	68
1. <i>Un évènement apparu deux fois au cours de l'évolution.</i>	68
2. <i>Un site de recombinaison original.</i>	69
3. <i>La réaction de recombinaison.</i>	70
II. LE CONTROLE DE LA RESOLUTION DES DIMERES DE CHROMOSOME PAR LA TRANSLOCASE FTSK	71
1. <i>Le contrôle du système XerS/<i>dif_{SL}</i>.</i>	71
2. <i>L'activation du système XerCD/<i>dif</i> par le sous-domaine γ de FtsK.</i>	72
3. <i>Importance de l'activation par le sous-domaine γ de FtsK.</i>	73
4. <i>Implications de FtsK dans la formation de la synapse de recombinaison.</i>	74
III. LES PROTEINES DE LA FAMILLE FTSK/SPOIII SONT ORIENTEES PAR DES MOTIFS CHROMOSOMIQUES	75
1. <i>La protéine FtsK_{SL} reconnaît un motif de 7pb.</i>	75
2. <i>Les protéines de la famille FtsK/SpoIII reconnaissent des polypurines.</i>	76
IV- MATERIEL ET METHODES	77
I. RESULTATS COMPLEMENTAIRES	77
<i>Plasmides</i>	77
<i>Oligonucléotides</i>	77
<i>Préparation des sondes radiomarquées</i>	78
<i>Expériences de retards sur gel</i>	79
<i>Expériences de coupure sur substrats suicides</i>	80
<i>Résolution de jonctions de Holliday</i>	80
II. ETUDE DES MOTIFS ORIENTANT LA TRANSLOCATION DE FTSK_{SL}	81
<i>Souches et plasmides</i>	81
<i>Purification des protéines 3γ</i>	81
<i>Oligonucléotides</i>	82
<i>Expériences de retards sur gel</i>	83
<i>Expériences de recombinaison in vivo</i>	83
<i>Western Blot</i>	83
V- ANNEXES	85
VI- BIBLIOGRAPHIE	89

ABBREVIATIONS

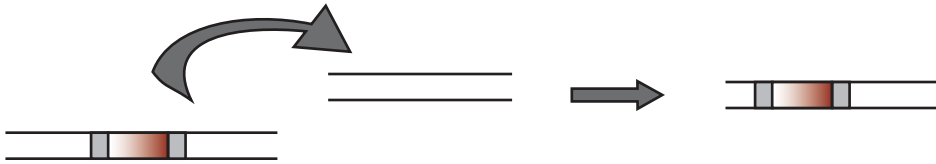
5'-OH	5'-hydroxyle	LB	<i>Luria Broth</i>
Å	angström	M	Mole par litre
A	Alanine	min	minute
AA	Acide aminé	µl	microlitre
AIMS	<i>Architecture IMparting Sequences</i>	nt	nucléotides
ADN	Acide Désoxyribonucléique	pb	paires de bases
ARN	Acide Ribonucléique	PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
ATP	Adénosine triphosphate		
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>	R	Arginine
°C	Degré Celsius	rpm	<i>Rounds Per Minute</i>
cpm	<i>Counts Per Minute</i>	S	Sérine
DTT	dithiothréitol	s	seconde
E	Glutamate	SDS-PAGE	électrophorèse en gel de polyacrilamide-sodium dodecyl sulfate
EDTA	Ethylène Diamine tetra-acétate de sodium	SRS	<i>SpoIIIE Recognition Sequence</i>
F	Phénylalanine	TBE	Tris-Borate-EDTA
G	Glycine	TGE	Tris-Glycine-EDTA
h	heure	V	Volts
H	Histidine	W	Tryptophane
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside	Y	Tyrosine
K	Lysine	YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
kb	kilo bases	%	pourcentage
kDa	Kilo Dalton		
KOPS	<i>FtsK Orienting Polarized Sequence</i>		

I- INTRODUCTION

A. La recombinaison homologue



B. La transposition



C. La recombinaison spécifique de site

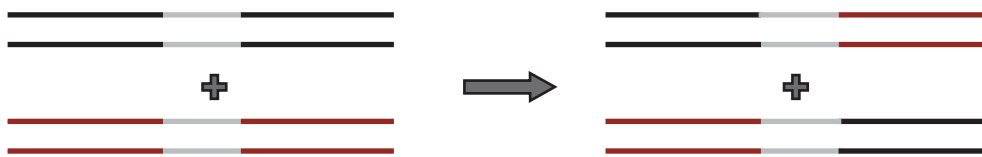


Figure 1. Les trois principaux mécanismes de recombinaison.

A. La recombinaison homologue. Ce mécanisme est notamment utilisé dans la réparation des cassures de la double hélice d'ADN comme le montre le schéma. **a.** Les deux brins d'ADN sont schématisés par deux traits noirs et gris. La cassure double brins est indiquée par une flèche. **b.** Les protéines impliquées dans la recombinaison homologue reconnaissent les lésions et permettent une "invasion" de brins de la molécule endommagée (en gris) au niveau de séquences homologues portées par la molécules d'ADN partenaires (en noir). **c.** La cassure est ensuite réparée en « copiant » l'ADN de la molécule indemne, ce qui est schématisé par des pointillés. **d.** La ligature des brins d'ADN réparés entraîne la formation de jonctions de Holliday. La résolution des jonctions suivant le sens indiqué par les triangles noirs conduit à un échange entre les deux molécules d'ADN partenaires comme représenté en **e.** **B. La transposition.** Les éléments transposables (schématisés par un rectangle gris et rouge) sont des séquences d'ADN capables de se déplacer sur le génome de manière autonome, on parle de transposition. Ils sont constitués à leurs extrémités de deux séquences (représentée par des rectangles gris) spécifiquement reconnues par les transposases. Les transposases catalysent les réactions d'excision et d'intégration, nécessaires à la mobilité de l'élément. **C. La recombinaison spécifique de site.** Ce mécanisme nécessite une séquence spécifique, le site de recombinaison (en gris), portée par les deux molécules d'ADN partenaires (schématisées par deux traits noirs ou rouges). Les recombinases sont les protéines qui reconnaissent spécifiquement les sites de recombinaison et qui, au niveau de ces séquences, coupent les brins d'ADN et les échantent pour les associer dans une nouvelle combinaison.

I- INTRODUCTION

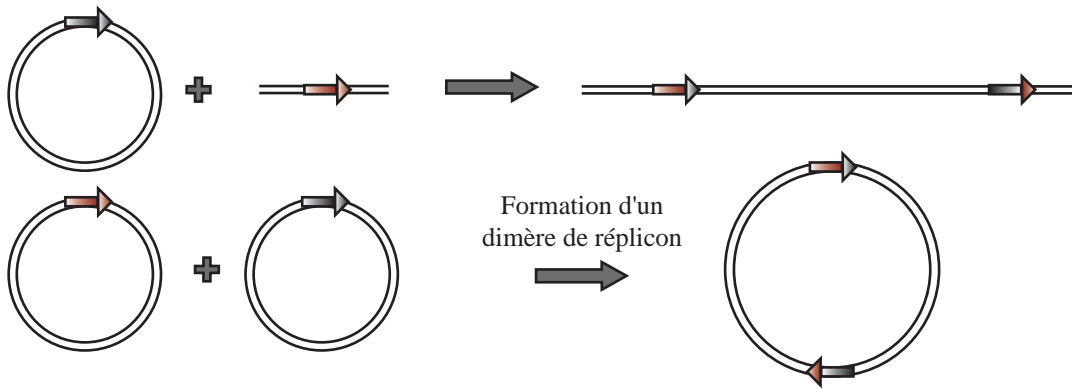
I. La recombinaison spécifique de site

La recombinaison génétique est un processus cellulaire par lequel les molécules d'ADN sont réarrangées. La redistribution du contenu génétique permet de créer de la diversité génétique et une meilleure adaptabilité. La recombinaison génétique permet également de réparer les molécules d'ADN afin qu'elles soient fidèlement transmises à la descendance, assurant ainsi la survie des cellules. Les trois principaux mécanismes de recombinaison employés sont la recombinaison homologue, la transposition et la recombinaison spécifique de site (Figure 1). La recombinaison homologue requiert une région d'homologie entre les deux ADN partenaires (Figure 1A). Les protéines impliquées ne sont pas spécialisées dans la reconnaissance de séquences particulières d'ADN. De ce fait, ce mécanisme peut être mis en opposition aux deux autres types de recombinaison qui sont souvent regroupés sous le terme de « recombinaison spécialisée ». La transposition est définie par la capacité d'une séquence d'ADN de se déplacer dans le génome de manière autonome (Figure 1B). L'ADN mobile, appelé élément transposable, est bordé de séquences spécifiquement reconnues par des enzymes, les transposases. Les transposases sont généralement codées par l'élément et catalysent les réactions d'excision et d'intégration qui assurent sa mobilité. Le dernier mécanisme utilisé par les cellules est la recombinaison spécifique de site (Figure 1C). A l'inverse des deux autres mécanismes cités, elle est dite « conservative » puisqu'elle n'exige ni de générer ni de dégrader les molécules d'ADN. Elle nécessite une courte séquence spécifique portée par les deux molécules d'ADN partenaires, le site de recombinaison. Les protéines spécialisées pour reconnaître les sites de recombinaison, couper les molécules d'ADN et les réassocier dans une nouvelle combinaison, sont appelées des recombinases.

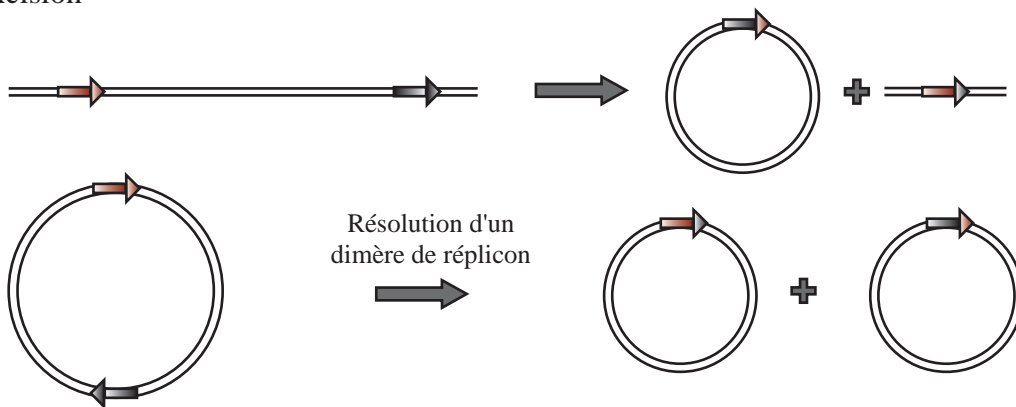
Suivant l'arrangement initial des deux sites de recombinaison, la recombinaison spécifique de site génère trois types d'évènements différents (Figure 2).

- L'intégration est le résultat d'un évènement de recombinaison entre deux sites portés par deux molécules d'ADN indépendantes. Elle conduit à la fusion des deux molécules dans une orientation prédéfinie.

A. Intégration



B. Excision



C. Inversion

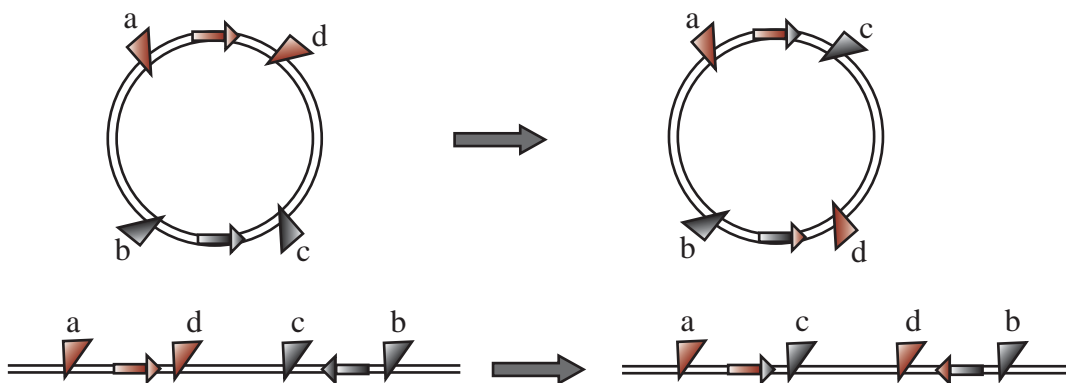


Figure 2. La recombinaison spécifique de site engendre trois types d'évènements différents.

A. Intégration d'une molécule d'ADN dans une autre. L'ADN est représenté par deux traits circulaires ou linéaires. Les sites de recombinaison sont schématisés par des flèches rouge et grise. Les deux sites portés par les molécules parentales se retrouvent en orientation directe sur la molécule générée après recombinaison. **B.** L'excision consiste en la réaction inverse de l'intégration. Elle nécessite donc que les sites portés par la molécule parentale soient positionnés en orientation directe. **C.** L'inversion d'un segment d'ADN (ab) par rapport à un autre (cd) consiste en un évènement de recombinaison entre deux sites portés par la molécule parentale en orientation inverse.

- L'excision est la conséquence de la recombinaison entre deux sites en orientation directe portés par la même molécule. C'est la réaction inverse de l'intégration puisqu'elle génère deux molécules à partir d'une seule.

- L'inversion est la résultante de la recombinaison entre deux sites portés par la même molécule et positionnés en orientation inverse. Elle entraîne le changement d'orientation d'un fragment d'ADN par rapport à un autre.

Ces trois types de recombinaison sont utilisés pour une grande variété de processus cellulaires, incluant l'intégration et l'excision des génomes phagiques de ceux de leurs hôtes, la résolution de dimères de réplicons, le contrôle de l'expression de certains gènes, mais également afin de créer de la diversité génétique par l'acquisition de nouveaux gènes (pour revues Hallet et Sherratt, 1997 ; Groth et Calos, 2004 ; Grindley *et al.*, 2006 ; Labbate *et al.*, 2009)

On distingue deux familles de recombinases, les recombinases à sérine précédemment appelées résolvases/invertases (pour revue Smith et Thorpe, 2002) et les recombinases à tyrosine précédemment connues sous le nom d'intégrases (pour revue Grindley *et al.*, 2006). Elles diffèrent dans la structure et la séquence protéique mais également dans le mécanisme de recombinaison employé. La première grande différence entre ces deux familles de protéines est l'acide aminé catalytique directement impliqué dans la coupure de la molécule d'ADN et qui a donné lieu à leurs noms respectifs. La seconde différence majeure concerne le mécanisme de recombinaison. Les recombinases à sérine catalysent des coupures double brin au niveau des deux sites de recombinaison, c'est-à-dire que tous les brins d'ADN sont coupés avant d'être échangés. Les recombinases à tyrosine réalisent une réaction de recombinaison en deux temps. Un seul brin du duplex d'ADN de chacun des deux sites est coupé et c'est seulement une fois qu'il est échangé que le deuxième brin est coupé puis échangé. Cette recombinaison produit ainsi un intermédiaire réactionnel appelé jonction de Holliday. Le sujet de cette thèse portant sur l'étude d'une recombinase à tyrosine, je m'attacherai seulement à détailler la famille des recombinases à tyrosine dans la suite de l'introduction.

Protéine	Origine	Structure (AA)	PDB	Référence
λ Int	Phage λ	Domaine catalytique mutant Y342F (177-355)	1ae9	(H J Kwon et al. 1997)
		Domaine N-terminal (1-64) (NMR)	1kjk	(Wojciak et al. 2002)
		Complexe covalent intégrase / substrat suicide (75-356)	1p7d	(Aihara et al. 2003)
		Complexe dimère / site cœur (75-356)	1z19	(Biswas et al. 2005)
		Complexe dimère / site cœur (1-356)	1z1b	(Biswas et al. 2005)
		Complexe tétramère / jonction de Holliday (1-356)	1z1g	(Biswas et al. 2005)
		Domaine CB de fixation au site cœur (75-176)	2oxo	(Kamadurai, Jain, et Foster 2008)
		Complexe domaine N-terminal / site P'2 (1-64) (NMR)	2wcc	(Fadeev, Sam, et Clubb 2009)
Intégrase HP1	Phage HP1	Domaine catalytique (168-337)	1aih	(Hickman et al. 1997)
Intégrase VchIntIA	<i>V. cholerae</i>	Complexe intégrase-attC (3-320)	2a3v	(MacDonald et al. 2006)
XerD	<i>E. coli</i>	Monomère (3-292)	1a0p	(Subramanya et al. 1997)
Cre	Phage P1	Complexe covalent Cre/substrat suicide loxA (20-341)	1crx	(F Guo, D N Gopaul, et van Duyne 1997)
		Complexe trimère Cre Y324F / jonction à trois branches (21-343)	1drg	(Woods et al. 2001)
		Complexe trimère CreY324F / jonction à trois branches (20-343)	1f44	(Woods et al. 2001)
		Complexe His ₆ -Cre/Jonction de Holliday loxP (mutation C/G) (2-343)	1kbu	(Shelley S Martin et al. 2002)
		Complexe Cre/Jonction de Holliday loxP (A8/T27) (2-343)	1ma7	(Shelley S Martin, Victor C Chu, et Enoch Baldwin 2003)
		Complexe synaptique Cre/loxP. Pré-coupeure (1-343)	1nzb	(Ennifar et al. 2003)
		Complexe Cre/loxP. Intermédiaire covalent (1-343)	1ouq	(Ennifar et al. 2003)
		Complexe Cre ALSHG/ loxm7(mutations dans les bras de fixation) (2-343)	1pvp	(Enoch P Baldwin et al. 2003)
		Complexe Cre INSGG/ loxm7(mutations dans les bras de fixation) (2-343)	1pvq	(Enoch P Baldwin et al. 2003)
		Complexe Cre INSGG/ loxP (2-343)	1pvr	(Enoch P Baldwin et al. 2003)
		Complexe Cre/loxP. Complexe pré-coupeure (1-343)	1q3u	(Ennifar et al. 2003)
		Complexe Cre/loxP. Intermédiaire covalent (1-343)	1q3v	(Ennifar et al. 2003)
		Complexe Cre/jonction de Holliday loxP piégée par un peptide inhibiteur (20-343)	1xns	(Ghosh et al. 2005)
		Complexe CreR173K/jonction de Holliday loxP (20-343)	1xo0	(Ghosh et al. 2005)
		Complexe Cre/ jonction de Holliday loxS (séquence lox symétrique) (1-343)	2crx	(D N Gopaul, F Guo, et G D Van Duyne 1998)
		Complexe synaptique Cre/loxP. Pré-coupeure. (1-343)	2hof	(Ghosh, Feng Guo, et Gregory D Van Duyne 2007)
		Complexe synaptique Cre/loxP. Pré-coupeure. (1-343)	2hoi	(Ghosh, Feng Guo, et Gregory D Van Duyne 2007)
		Complexe CreR173K/jonction de Holliday synthétique (1-343)	3crx	(D N Gopaul, F Guo, et G D Van Duyne 1998)
		Etat de transition complexe covalent Cre/ADN	3mgv	(Gibb et al. 2010)
		Complexe synaptique Cre R173K/loxS (séquence lox symétrique) (20-341)	4crx	(F Guo, D N Gopaul, et G D Van Duyne 1999)
Complexe synaptique Cre Y324F/ loxS (séquence lox symétrique) (1-343)	5crx	(F Guo, D N Gopaul, et G D Van Duyne 1999)		
Flp	<i>S. cerevisiae</i>	Complexe Flp / jonction de Holliday (2-423)	1flo	(Y Chen et al. 2000)
		Complexe mutant Flpe / jonction de Holliday (3-423)	1m6x	(Conway, Yu Chen, et Phoebe A Rice 2003)
		Complexe FlpW330F / jonction de Holliday (3-423)	1p4e	(Yu Chen et Phoebe A Rice 2003)

Tableau 1 : Structures accessibles pour les recombinases à tyrosine.

Sont indiqués le nom de la recombinase à tyrosine, l'organisme d'origine, une précision sur la structure ainsi que la longueur de la protéine en acides aminés (AA), le code PDB, et la référence.

II. Les recombinases à tyrosine

1. Généralités

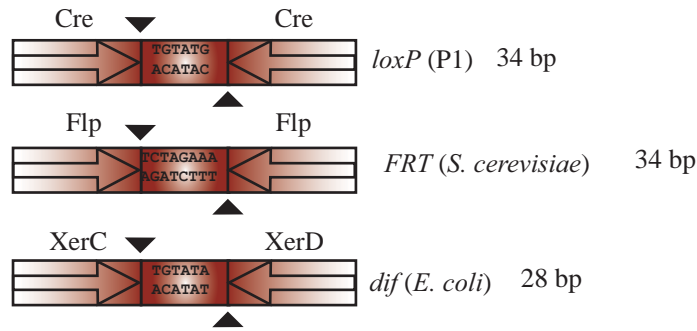
Les recombinases à tyrosine sont retrouvées dans les trois royaumes du vivant, Eucaryote, Archae et Bactéries, mais également dans le monde viral (bactériophages et virus). C'est une famille de protéines largement représentée puisqu'elle compte plus de 7800 membres répertoriés dans la collection Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)(Bateman *et al.*, 2004). Elles sont caractérisées par un domaine catalytique conservé au niveau de motifs particuliers (Esposito et Scocca, 1997) et au niveau de sa conformation tridimensionnelle. D'autre part, la réaction de recombinaison qu'elles catalysent a la particularité de créer un intermédiaire réactionnel où la recombinase est liée de manière covalente en 3' de l'ADN substrat. De part la structure du domaine catalytique et de la chimie des réactions de coupure et de ligature des brins d'ADN, les recombinases à tyrosine sont associées à deux autres classes d'enzymes, les topoisomérases IB (Cheng *et al.*, 1998 ; Sherratt et Wigley, 1998) et les protéomérases (Kobryn et Chaconas, 2001). Les topoisomérases permettent la modification et la régulation de la topologie de l'ADN (pour revue Champoux, 2001). Les topoisomérases IB relâchent la superhélicité positive et négative de l'ADN, en catalysant la coupure d'un brin du duplex d'ADN, en assurant le passage du deuxième brin à travers cette coupure, et en religaturant le brin coupé. Les protéomérases ou télomère résolvas sont des enzymes procaryotes qui protègent les extrémités des chromosomes et plasmides linéaires par la formation de structures en épingle à cheveux (Jayaram, 2007 ; Chaconas, 2005).

1.1. Les systèmes modèles

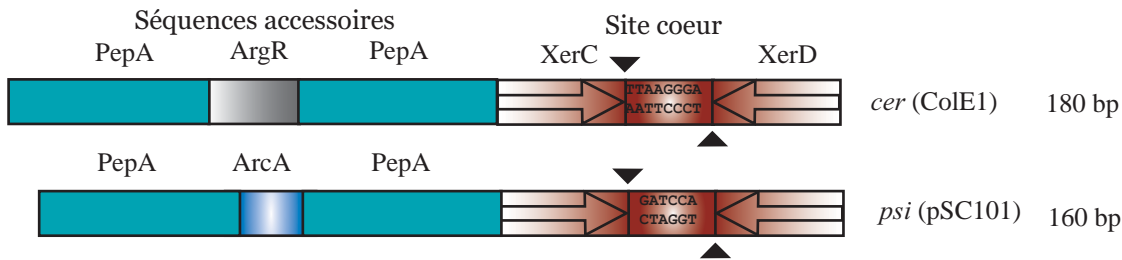
De nombreuses études biochimiques et structurales ont permis de grandes avancées quant à la compréhension des mécanismes de recombinaison et de contrôle de la réaction catalysée par les recombinases à tyrosine. Le tableau 1 liste les nombreuses structures accessibles pour les recombinases à tyrosine. Les structures obtenues correspondent aux protéines impliquées dans les systèmes de recombinaison les plus étudiés. Suivant le mécanisme de recombinaison utilisé, il est possible de classer ces systèmes en trois groupes.

Le premier englobe les systèmes Cre/*loxP* du bactériophage P1 et Flp/*FRT* de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ce sont des systèmes « simples », c'est-à-dire que la réaction de

A. Sites de recombinaison minimaux ou sites coeurs.



B. Sites de recombinaison Xer plasmidiques.



C. Intégration et excision du phage λ.

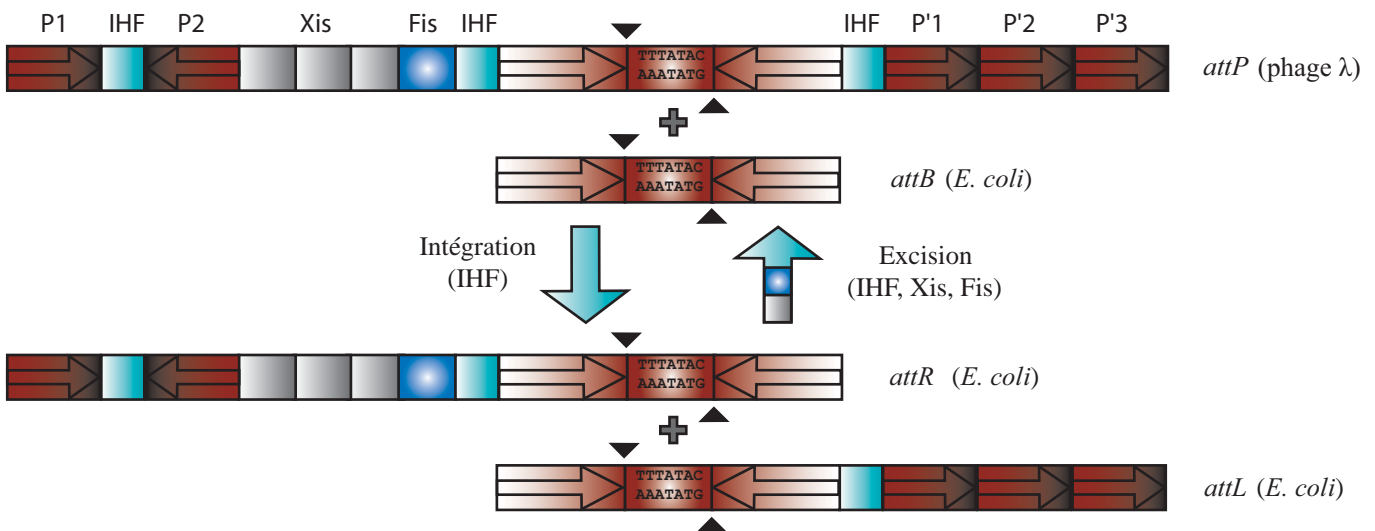


Figure 3. Organisation des sites de recombinaison.

A. Représentation schématique de trois sites de recombinaison minimaux, également appelés sites cœurs, le site *loxP* du bactériophage P1, le site *FRT* de *Saccharomyces cerevisiae* et le site *dif* d'*Escherichia coli*. La longueur du site ainsi que la séquence asymétrique de la région centrale (variant de 6 à 8pb) sont indiqués. Les bras de fixation des recombinase Cre, Flp et XerC et XerD, respectivement, constitués de séquences inversées répétées, sont représentés par des flèches orientées vers la région centrale. Les sites de coupures, catalysés par les recombinases, sont situés à la jonction des bras de fixation et de la région centrale, et sont indiqués par des triangles noirs. **B et C.** Exemple d'organisation de sites de recombinaison complexes. **B.** Les sites *cer* et *psi* plasmidiques d'*E. coli* sont constitués d'une région cœur représentée comme en A et de séquences accessoires reconnues par les protéines PepA (en vert) et ArgR (en gris) ou ArcA (en bleu). **C.** Intégration et excision du bactériophage λ. Le site *attP*, porté par le génome phagique, est constitué d'une région cœur, de nombreuses séquences accessoires reconnues par les protéines IHF (en vert), Xis (en gris) et Fis (en bleu), et des bras de fixation accessoires (P et P'), indiqués en rouge, reconnus par le domaine amino terminal de la recombinase λ Int. Le site partenaire dans la réaction de recombinaison, *attB*, est porté par le génome bactérien et est constitué seulement d'un site cœur. Les deux substrats étant organisés différemment, la réaction de recombinaison engendre la formation de deux produits différents, les sites *attL* et *attR*. Alors que IHF est nécessaire pour l'intégration et pour l'excision, les protéines accessoires Xis et Fis sont requises seulement pour la réaction de recombinaison excisive.

recombinaison ne nécessite pas de topologie particulière de l'ADN substrat, et les réactions *in vitro* ne nécessitent aucune protéine accessoire. Le système *Cre/loxP* est impliqué dans la circularisation du génome linéaire et dans la résolution des dimères de chromosome, causés par des événements de recombinaison homologue lors de la réplication du génome circulaire (Austin *et al.*, 1981). Flp aide au maintien du nombre de copies du plasmide 2 μ m en inversant des segments d'ADN lors de la réplication (pour revue Jayaram *et al.*, 2004).

Le deuxième groupe correspond aux systèmes qui nécessitent des facteurs accessoires pour diriger la réaction de recombinaison. On retrouve les intégrases des phages λ (pour revue Landy, 1989) et HP1 (Esposito *et al.*, 2001), qui sont responsables de l'intégration et de l'excision de l'ADN phagique du génome de leurs hôtes respectifs, *E. coli* et *H. influenzae*. C'est également le cas des recombinases XerC et XerD d' *E. coli*, qui assurent la ségrégation des chromosomes et des plasmides, en résolvant les formes dimériques en monomères (chapitre III).

L'intégrase VchIntIA de *V. cholerae* est impliquée dans la capture de cassettes de gènes par les intégrons (pour revue Mazel, 2006). Le mécanisme de recombinaison utilisé par les intégrons est particulier, ce qui le classe à part des deux autres groupes (paragraphe II.3.2).

1.2. Les sites de recombinaison

Les recombinases à tyrosine reconnaissent un site spécifique de fixation à l'ADN de taille variable. Les sites minimaux, appelés sites cœurs, sont constitués de deux bras de fixation des recombinases de 11 à 13 pb, encadrant une région centrale de 6 à 8pb (Figure 3A). Les bras de fixation sont composés de séquences inversées répétées. Chacun des deux bras est dédié à la fixation d'un monomère de recombinaison. La recombinaison *Cre* reconnaît le site *loxP* de 34pb, Flp le site *FRT* de 34pb, et les recombinases XerC et XerD le site *dif* de 28pb, ainsi que les sites *cer* et *psi*. Les réactions de coupure et d'échange de brins se font de part et d'autre de la région centrale, chacune des deux recombinases étant dédiée à la coupure d'un brin différent de la double hélice d'ADN (Figure 3). La région centrale est asymétrique, de ce fait elle définit l'orientation des sites sur l'ADN substrat. De nombreux mécanismes de recombinaison utilisent des sites plus complexes composés d'un site cœur et de séquences accessoires comme le système Xer plasmidique (Figure 3B) ou l'intégration/excision du phage lambda (Figure 3C). Les protéines interagissant avec les séquences accessoires ont un rôle architectural qui contrôle et dirige la réaction de recombinaison. L'intégration/excision du phage lambda est le paradigme des systèmes de recombinaison utilisant des protéines

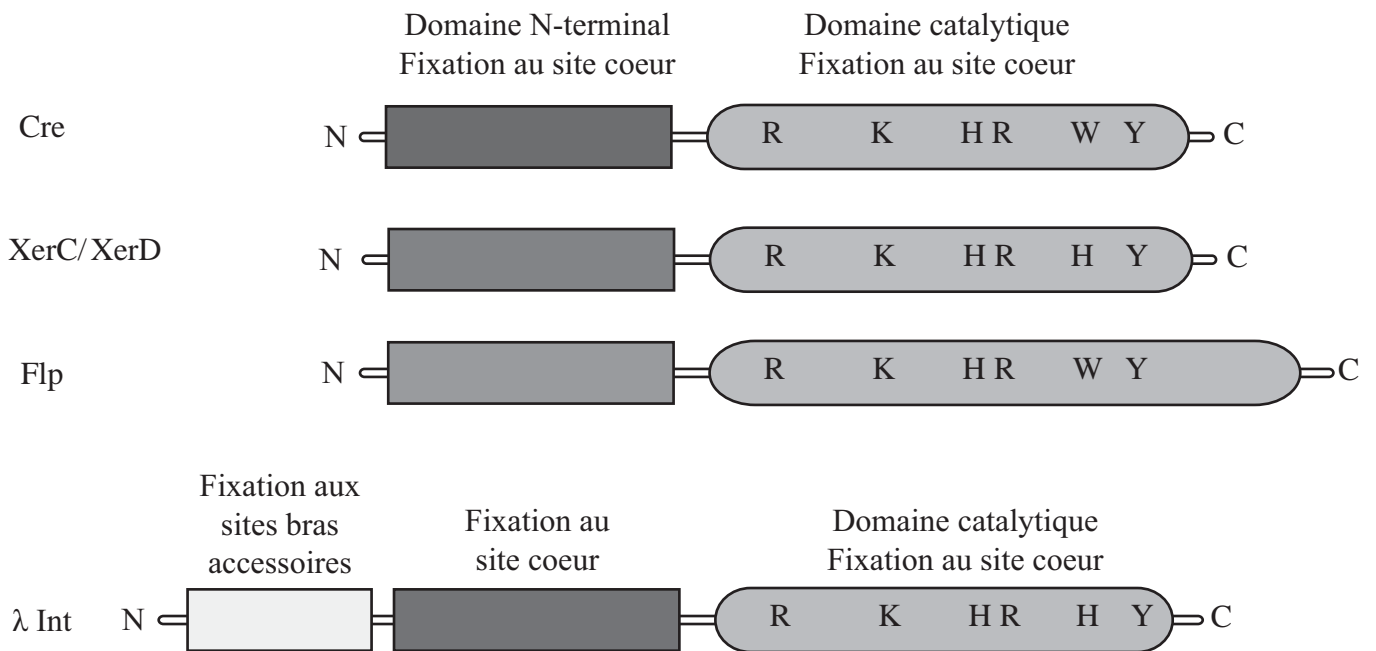


Figure 4. Organisation des recombinases à tyrosine.

Représentation schématique des recombinases à tyrosine Cre, XerC, XerD, Flp et λ Int. Elles sont composées d'un domaine catalytique conservé et d'un domaine N-terminal variable. Les six acides aminés catalytiques R-K-H/K-R-H/W-Y sont indiqués. Pour les recombinases Cre, XerC, XerD et Flp, la région N-terminale est constituée d'un domaine qui contribue à la fixation au site de recombinaison. L'intégrase λ Int possède un domaine additionnel à l'extrémité N-terminale, dédié à la fixation aux sites bras accessoires (Figure 3).

accessoires, aidant à l'assemblage du complexe appelé intasome et dirigeant la réaction de recombinaison (pour revue Radman-Livaja *et al.*, 2006). Les sites de recombinaison portés par les génomes phagique (*attP*) et bactérien (*attB*) sont différents (Figure 3C). Les deux sites sont constitués du site cœur de 15pb. En revanche, les séquences accessoires permettant la fixation des protéines IHF, Fis, et Xis, ainsi que les bras de fixation accessoires pour le domaine N-terminal de l'intégrase sont seulement portées par le phage. De ce fait, la réaction de recombinaison génère deux nouveaux sites appelés *attL* et *attR* (Figure 3). Ainsi, l'excision, qui requiert les protéines IHF, Xis et Fis, ne correspond pas à la réaction inverse de l'intégration qui nécessite seulement la présence de la protéine IHF (Thompson *et al.*, 1987).

1.3. Organisation des recombinases à tyrosine

De part la séquence primaire en acides aminés, les recombinases à tyrosines montrent peu de similarités. Néanmoins, la famille est caractérisée par une organisation, généralement en deux domaines, et une structure du domaine catalytique conservée. Le domaine C-terminal correspond au domaine catalytique (Figure 4). De nombreuses études par mutagenèses associées à des données structurales ont permis de révéler qu'il porte six résidus conservés, R-K-H/K-R-H/W-Y, nécessaires pour catalyser les réarrangements précis entre les deux sites de recombinaison (pour revues Gopaul et Duyne, 1999 ; Champoux, 2001 ; Chen et Rice, 2003). Le domaine N-terminal est beaucoup plus variable que le domaine catalytique. Il est impliqué, avec le domaine C-terminal, dans la fixation au site de recombinaison et dans les interactions protéines/protéines nécessaires à la réaction de recombinaison.

Dans certains cas, comme l'intégrase du phage λ , l'organisation diffère par la présence d'un domaine supplémentaire à l'extrémité N-terminale de la protéine (Figure 4). La fixation à l'ADN se fait alors de manière hétérobivalente, puisque ces protéines ont la capacité de fixer deux séquences différentes et éloignées l'une de l'autre. Le domaine additionnel, à l'extrémité N-terminale de la protéine, est dédié à la fixation de la recombinase aux sites bras accessoires du site de recombinaison (Figure 3C). Il est ainsi impliqué dans la formation de l'intasome, une structure complexe qui dirige la réaction de recombinaison. Le domaine central se fixe au site cœur, de la même manière que le domaine N-terminal de Cre, Flp, XerC ou XerD, décrit précédemment.

Dans d'autre cas, comme pour les recombinases FimB et FimE, les protéines sont dépourvues du domaine N-terminal (Klemm, 1986).

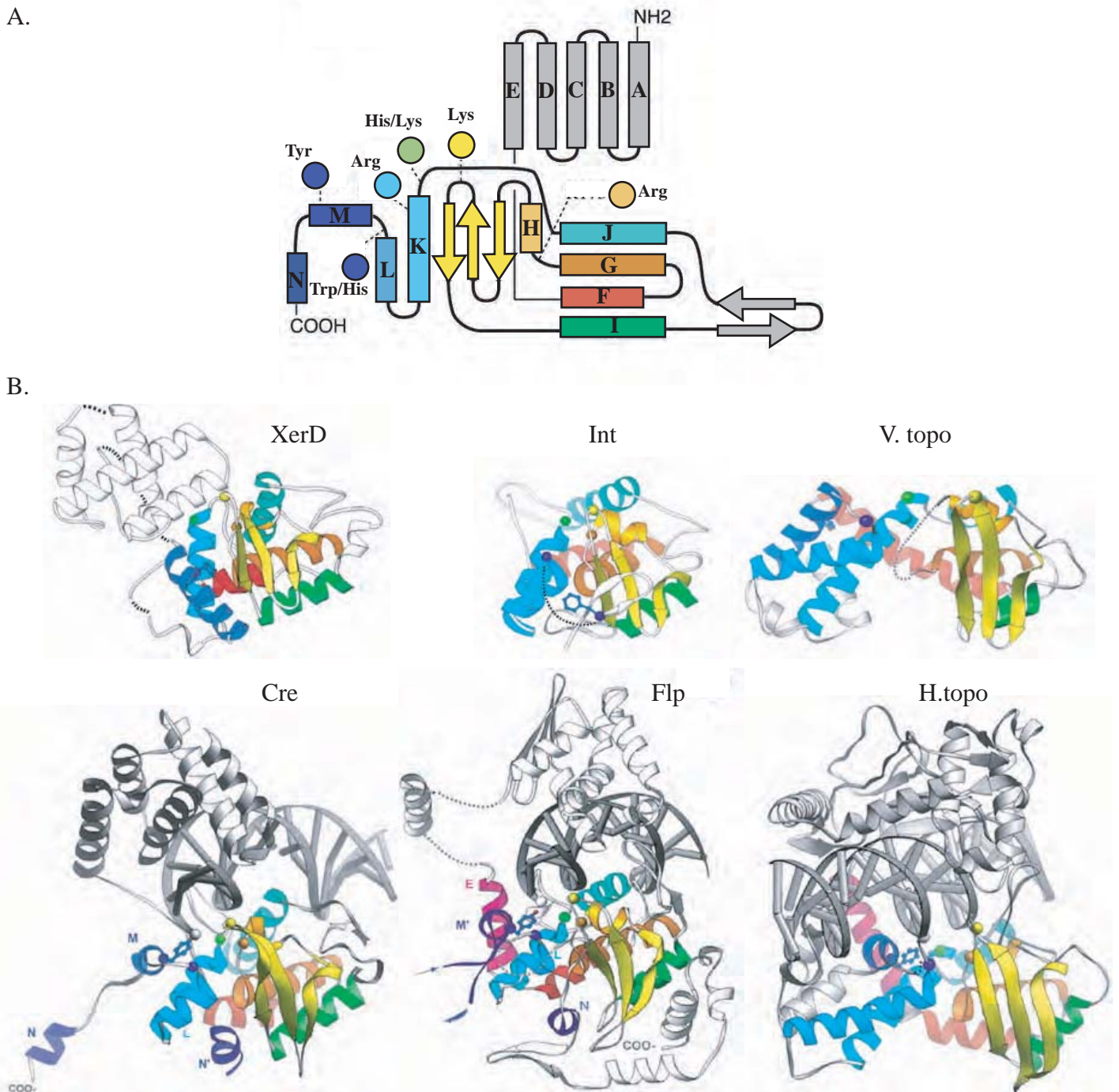


Figure 5. Architecture du domaine catalytique des recombinases à tyrosine.

A. Représentation de la structure de la recombinase Cre. Les hélices A à E forment le domaine N-terminal, tout le reste correspond au domaine catalytique. Les acides aminés catalytiques conservés sont représentés par des sphères colorées et sont positionnés sur la structure (Adapté de Van Duyne, 2001). **B.** Conservation de l'architecture du domaine catalytique des recombinases à tyrosines. Les structures de la recombinase XerD, des domaines catalytiques de l'intégrase Int du bactériophage lambda et de la topoisomérase du virus de la vaccine V.topo, ainsi que les structures des recombinases Cre, Flp et de la topoisomérase I humaine H.topo complexées à l'ADN sont représentées. Le code couleur utilisé est le même qu'en A et les résidus catalytiques sont représentés par des sphères, hormis la tyrosine catalytique qui est représentée suivant le modèle « *stick-and-ball* ». Sur l'ADN, le phosphate scissile est indiqué par une sphère grise. Les hélices représentées des monomères attenants sont indiquées par le symbole (*), c'est le cas de l'hélice C-terminale N' pour Cre et de l'hélice M' portant la tyrosine catalytique pour Flp. Le mode de fixation à l'ADN ainsi que la structure du domaine catalytique sont conservés. En absence d'ADN, l'hélice M est positionnée différemment ce qui fait que la tyrosine catalytique se retrouve éloignée des autres résidus catalytiques (Chen et Rice, 2003).

1.4. Structure du domaine catalytique

Dans la structure tridimensionnelle les six résidus R-K-H/K-R-H/W-Y sont regroupés dans une poche catalytique (Figure 5). Ils permettent d'assurer les réactions de coupure et d'échanges de brins. L'architecture du domaine catalytique est conservée dans la famille des recombinases à tyrosine, et dans la famille des topoisomérases de type IB, comme le montrent la structure du domaine C-terminal de la topoisomérase du virus de la vaccine et le cocrystal de la topoisomérase I humaine complexée à l'ADN (Figure 5B).

Les résidus catalytiques sont conservés parmi les membres de la famille des recombinases à tyrosine, cependant, le site catalytique peut être assemblé de deux manières différentes. Pour la majorité des recombinases à tyrosine, les résidus formant la poche catalytique sont portés par le même monomère. La coupure catalysée par ce monomère est dite « en *cis* ». Pour d'autres enzymes comme Flp (Lee *et al.*, 1999) et peut être l'intégrase SSV1 (Letzelter *et al.*, 2004), le site actif est formé en introduisant le résidu tyrosine d'un monomère, porté par l'hélice M (Figure 5), aux cinq acides aminés R-K-H/K-R-H/W d'un deuxième monomère. La formation de la poche catalytique nécessite donc l'association de deux monomères qui catalysent une coupure dite « en *trans* » (Dixon *et al.*, 1995 ; Grainge et Jayaram, 1999 ; Lee *et al.*, 1999 ; (Blakely et Sherratt, 1996b).

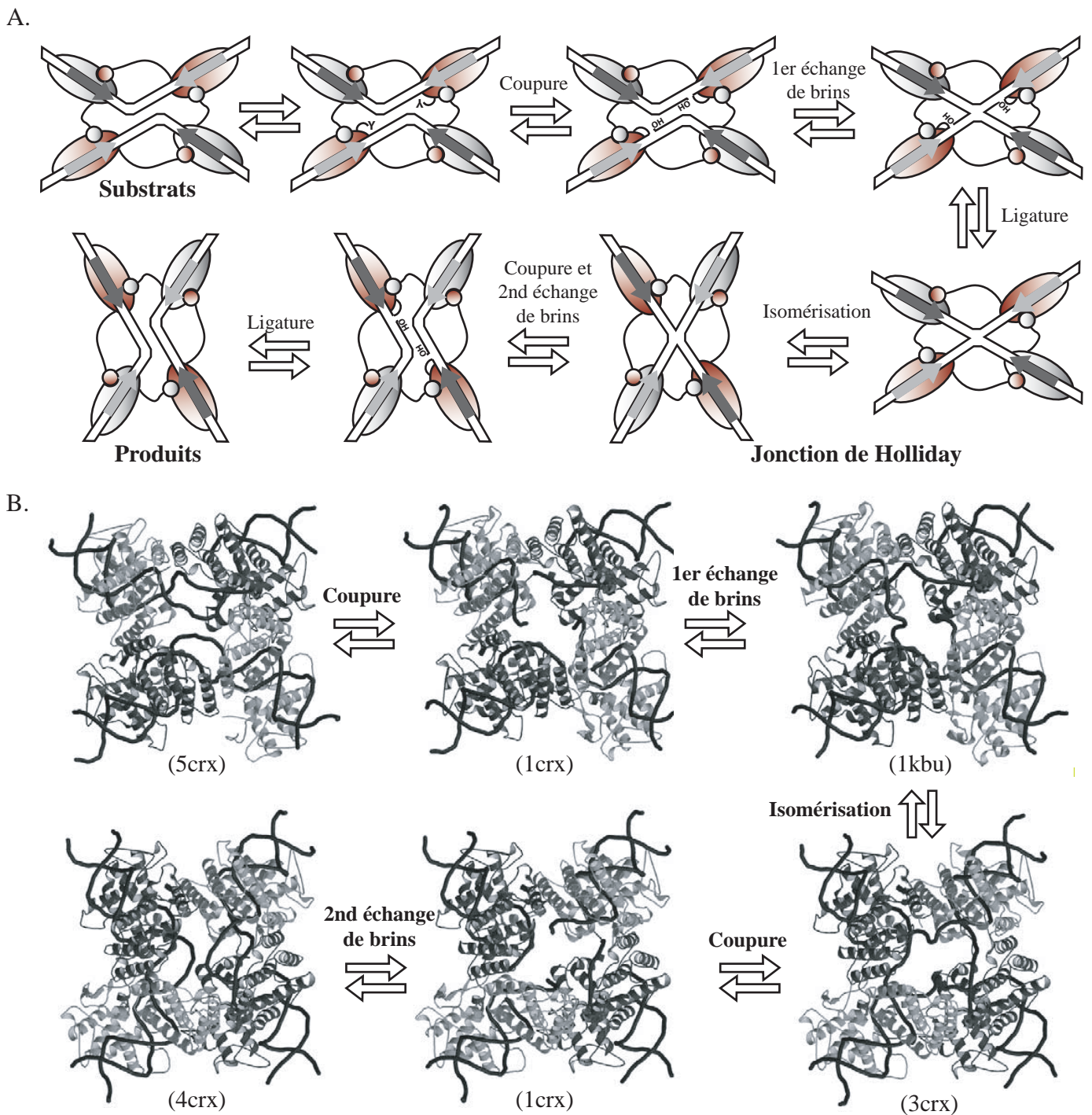


Figure 6 : Modèle de recombinaison catalysée par les recombinases à tyrosine.

A. Mécanisme de recombinaison catalysé par les recombinases à tyrosine. L'ADN portant le site de recombinaison est schématisé par deux traits. Les deux bras de fixation des recombinases sont représentés par des flèches grises, une foncée pour le bras gauche et une claire pour le bras droit. Le complexe synaptique est formé de deux ADN substrats et de quatre monomères de recombinase (représentés par des cercles). L'hélice C-terminale échangée entre monomères est représentée par une boule. La réaction de recombinaison débute par l'attaque des phosphates scissiles par les tyrosines catalytiques portées par le couple de recombinases actives (en rouge). La tyrosine catalytique est indiquée (Y) ainsi que le groupement 5'-OH libéré. Il s'en suit une étape d'échange de brins, et l'attaque de la liaison phosphotyrosyl par le groupement hydroxyl de l'ADN partenaire. Cette réaction conduit à la formation d'une jonction de Holliday qui, après isomérisation, est résolue en produits par le deuxième couple de recombinase, suivant le même mode opérationnel. **B.** Les étapes de la réaction de recombinaison décrites précédemment, sont représentées par des structures obtenues avec la recombinase Cre. On retrouve le complexe synaptique, l'intermédiaire réactionnel où la recombinase est liée covalamment à l'ADN par une liaison phosphotyrosyl, et la jonction de Holliday. Le code PDB de chacune des structures est indiqué en dessous (Changela *et al.*, 2003).

2. La réaction de recombinaison

La réaction de recombinaison nécessite quatre monomères de recombinase et deux sites de recombinaison, assemblés en un complexe appelé synapse de recombinaison. Elle consiste en deux étapes successives (Figure 6A). Un premier échange de brin entre les deux ADN substrats, catalysé par un premier couple de recombinase, entraîne la formation de l'intermédiaire de la réaction qui est une jonction de Holliday. La résolution de la jonction de Holliday en produits de recombinaison est par la suite catalysée par le deuxième couple de recombinases. La particularité de la réaction de coupure catalysée par les recombinases à tyrosine est qu'elle implique un intermédiaire où les protéines sont liées de manière covalente à l'ADN.

Les nombreuses données structurales ont contribué à la compréhension de la réaction de recombinaison. Ainsi, un modèle précis a pu être établi principalement grâce aux structures obtenues avec la recombinase Cre (Figure 6B).

2.1. Fixation des protéines au site de recombinaison

Différentes données structurales de complexes synaptiques et de jonction de Holliday montrent que les deux domaines des recombinases forment une structure en C, appelée « C-shaped clamp », qui entoure la molécule d'ADN. L'ADN formant un plan, d'un côté le domaine N-terminal interagit avec le sillon majeur proche de la région centrale et, de l'autre côté, relié par une séquence linker, le domaine C-terminal interagit successivement avec les sillons mineur, majeur, et mineur (Figure 5B) (Van Duyne, 2001).

Les recombinases à tyrosine se fixent sur leur site sous forme monomérique et avec une forte coopérativité : la fixation d'un monomère sur un bras du site favorise considérablement la fixation du second monomère sur le deuxième bras du site. Cette coopérativité de fixation à l'ADN des recombinases proviendrait en partie des interactions protéines/protéines entre les monomères positionnés sur un même site (Van Duyne, 2001 ; Spiers et Sherratt, 1997 ; Spiers et Sherratt, 1999). Dans certains cas, comme Cre, les études ont mis en évidence une affinité similaire pour chacun des bras de fixation (Ringrose *et al.*, 1998), suggérant qu'il n'y a pas un ordre défini d'assemblage sur le site de recombinaison. En revanche, dans d'autres systèmes comme Xer, qui implique deux recombinases différentes, il

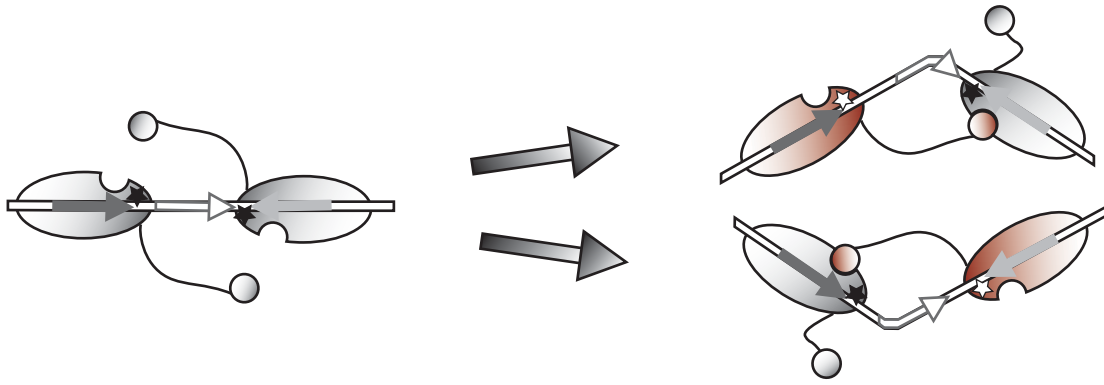


Figure 7. La courbure indique le brin du duplex coupé en premier.

La fixation des recombinases sur leurs sites, associé à la séquence nucléotidique de la région centrale, induit une courbure asymétrique de l'ADN. Cette courbure détermine le brin du duplex d'ADN coupé en premier. Sur la figure sont schématisées les deux courbures différentes que peut prendre un complexe nucléoprotéique constitué de deux recombinases fixées sur leur site. La représentation est la même que celle utilisée figure 6. La région centrale est schématisée par une flèche blanche. Le phosphate activé du brin qui va être coupé est indiqué par une étoile blanche alors que le phosphate non activé est représenté par une étoile noire. Dans tous les cas étudiés, la recombinase active (en rouge) correspond à celle qui donne son hélice C-terminale, schématisée par une boule, à la recombinase inactive (en gris) (adapté de Grainge et Jayaram, 1999).

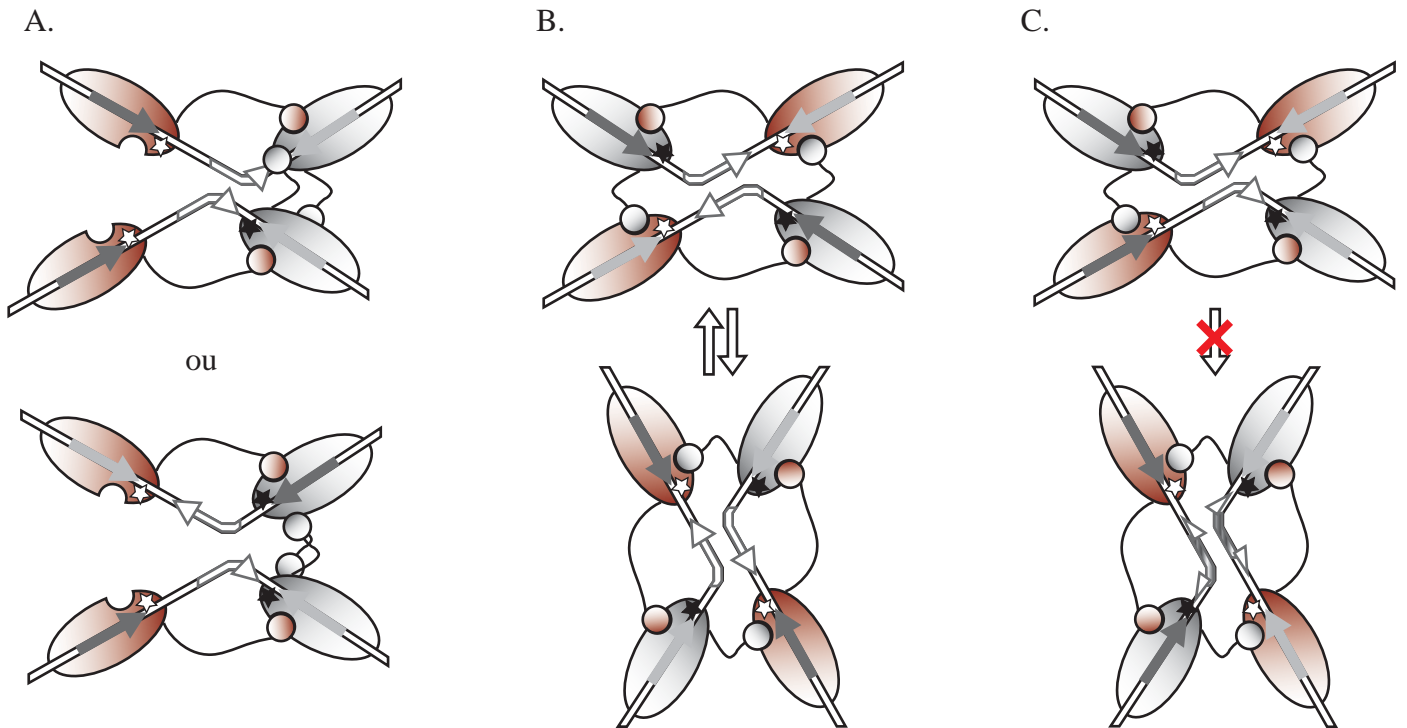


Figure 8. L'assemblage du complexe synaptique contrôle la recombinaison.

A partir des deux courbures différentes que peut prendre le site sur lequel sont positionnées les recombinases (Figure 7), seulement deux combinaisons conduisent à la formation d'un complexe synaptique (B et C). En effet, l'assemblage en orientation parallèle de deux ADN courbés de la même manière ou l'assemblage de manière antiparallèle de deux ADN courbés différemment (A), ne permet pas les interactions nécessaires à la formation d'un complexe synaptique. Cependant, parmi les deux assemblages différents du complexe synaptique, seulement la combinaison de deux ADN de même courbure en orientation antiparallèle (B) conduit à une réaction de recombinaison productive. En effet, la recombinaison entre deux ADN courbés différemment et orientés de manière parallèle (C), conduirait à des mésappariements dans la région centrale. De ce fait, la réaction est inhibée après la coupure, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'étape de ligature et la réaction inverse est favorisée (adapté de Grindley *et al.*, 2006).

a été démontré que XerD a une meilleure affinité pour son bras de fixation que XerC pour le sien (Blakely *et al.*, 1993), suggérant que la fixation au site se fait dans un ordre défini.

La fixation des recombinases sur leurs sites induit une courbure asymétrique au niveau de la région centrale qui, suivant la conformation adoptée, détermine quel brin du duplex va être coupé (Figure 7). En effet, il a été mis en évidence dans le cas de Cre que lorsque la courbure se fait à la jonction du bras gauche c'est la recombinase fixée sur le bras droit qui est active (Ghosh *et al.*, 2007). L'ADN substrat n'est pas seulement une cible passive puisque la courbure asymétrique dans la région centrale est dépendante de la séquence nucléotidique, comme le montrent les structures de complexes Cre/*loxP* (Martin *et al.*, 2002 ; Ennifar *et al.*, 2003 ; Van Duyne, 2001) et les données biochimiques où la position des phosphates scissiles GpC et ApT ont été inversée (Ghosh *et al.*, 2005 ; Ghosh *et al.*, 2007). L'assemblage des deux protéines sur leur site, associé à la séquence nucléotidique de la région centrale, dicte ainsi un ordre d'échange de brin qui permet, dans le complexe synaptique, la coordination des réactions de coupures au niveau des deux sites partenaires, assurant une réaction de recombinaison productive. Cependant, il n'est pas encore évident que la courbure nécessaire à la réaction de recombinaison soit induite avant la formation du complexe synaptique. En effet, jusqu'à présent aucune donnée structurale n'a pu être obtenue avec un site sur lequel sont positionnées les deux recombinases. De ce fait, on ne sait pas si un ordre particulier d'assemblage sur le site définit une courbure précise, ou si c'est au niveau du complexe synaptique que se met en place le contrôle de l'ordre d'échange des brins, par la courbure de l'ADN.

2.2. Le complexe synaptique

Le complexe synaptique correspond à l'assemblage des deux sites substrats, portant chacun deux monomères de recombinase, dans un complexe préparant les réactions de coupure et d'échange de brins. La formation du complexe synaptique est l'étape limitante de la réaction de recombinaison. En effet, deux niveaux de contrôle assurent une réaction productive. Les sites doivent adopter la même courbure, indiquant lequel des deux brins est coupé en premier, et doivent être positionnés de manière anti-parallèle dans le complexe synaptique (Figure 8).

Les structures de complexes synaptiques montrent que, sur un côté du plan formé par l'ADN, les domaines N-terminaux des recombinases forment une structure tétramérique symétrique. Ils interagissent par des contacts hélice-hélice et boucle-hélices, mais ils

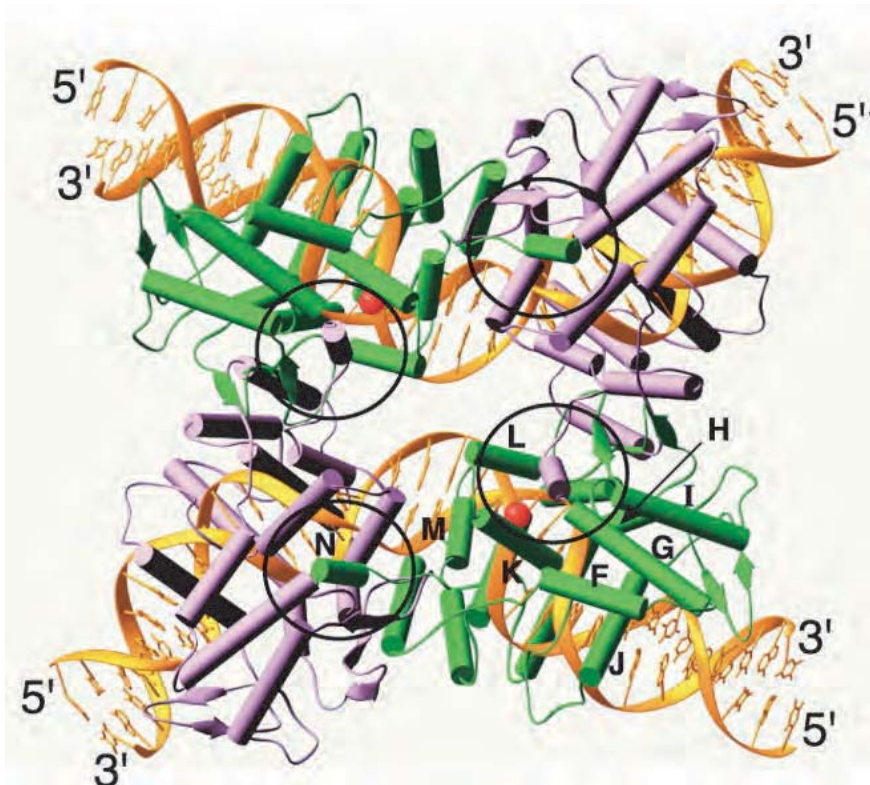


Figure 9 : Structure du complexe synaptique formé par Cre R173K sur un site *loxP* symétrique.

La synapse est montrée du côté des domaines catalytiques. Les sous unités colorées en vert sont actives pour la coupure alors que les sous unités colorées en violet ne le sont pas. Pour la sous unité en bas à droite, le nom de chacune des hélices est indiqué suivant la même nomenclature que pour la figure 5A. L'hélice N, qui interagit avec la sous unité attenante, est encerclée. On remarque que le monomère actif est celui qui donne son hélice N au monomère adjacent, positionné sur le même ADN (Van Duyne, 2001).

n'interagissent pas avec le domaine catalytique. Dans le cas de la recombinaison Cre, cet arrangement des domaines N-terminaux est retrouvé au niveau de la synapse de recombinaison, des substrats coupés, et de la jonction de Holliday sans changement de structure quaternaire. Il apparaît ainsi que les domaines N-terminaux de Cre forment une structure relativement rigide, qui persiste tout au long de la réaction de recombinaison catalysée au site *loxP* (Van Duyne, 2001).

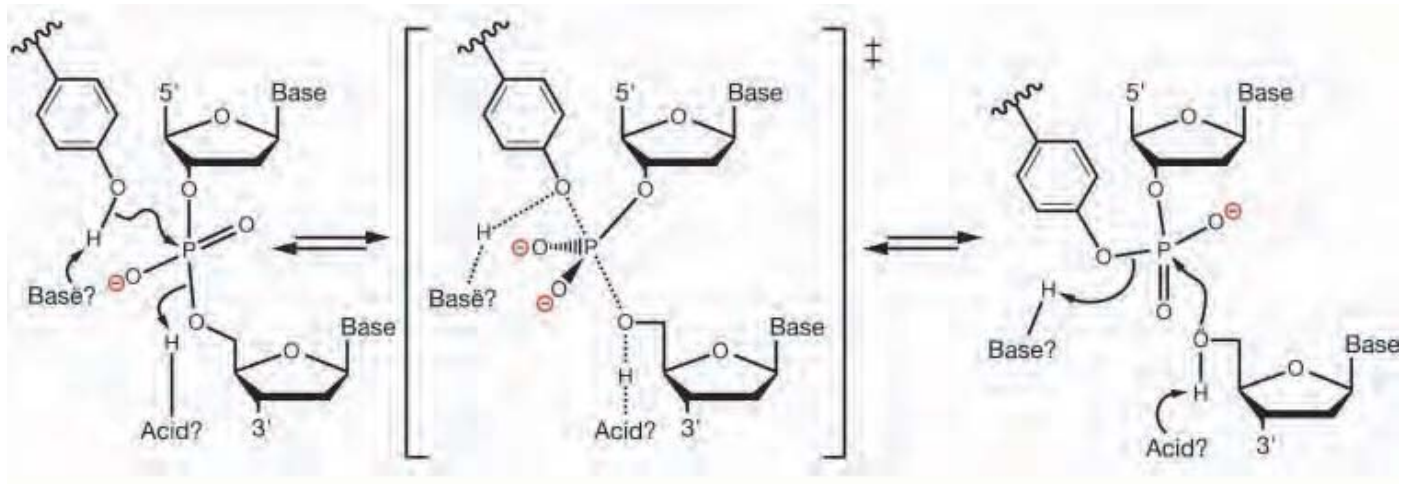
Sur la face opposée du complexe, et de manière indépendante, les domaines catalytiques interagissent par un échange d'hélices (l'hélice N, figure 9) localisées à l'extrémité du domaine C-terminal. L'hélice C-terminale d'un monomère « plonge » sa surface hydrophobe dans une poche « réceptrice » de la sous-unité adjacente. L'échange d'hélices C-terminale n'est pas réciproque entre les monomères liés sur un même site, cet échange est cyclique entre les quatre recombinaisons formant le complexe synaptique. Néanmoins, il existe certaines exceptions dans la littérature. La structure du domaine catalytique de l'intégrase du bactériophage HP1 montre que l'échange d'hélices C-terminale se fait de manière réciproque, formant ainsi un dimère d'intégrase HP1 (Hickman *et al.*, 1997). Ce système implique des protéines accessoires nécessaires à l'assemblage d'une synapse de recombinaison productive, ce qui pourrait expliquer que les interactions entre les quatre monomères de recombinaison puissent être différentes dans ce cas (Esposito *et al.*, 2001). Cependant, la structure a été obtenue en absence d'ADN, ce qui laisse également la possibilité que la protéine puisse se structurer différemment lorsqu'elle est fixée à l'ADN.

L'interaction entre recombinaisons via l'échange d'hélices C-terminale est importante pour la coopérativité de fixation au site de recombinaison. Bien que le mécanisme ne soit pas compris, c'est également un moyen de communication important entre les recombinaisons du complexe de recombinaison puisqu'il est impliqué dans l'activation et/ou l'inhibition de l'activité catalytique du/des monomères voisins, assurant ainsi que les protéines diamétralement opposées soient dans la même configuration (Hallet *et al.*, 1999). D'autre part, les structures obtenues jusqu'à présent montrent que la recombinaison active est toujours celle qui donne son hélice C-terminale au monomère adjoignant, positionné sur le même site de recombinaison (Figure 9).

2.3 La réaction de coupure

La réaction de coupure ne nécessite pas de cofacteurs métalliques ou énergétiques. Elle consiste en une attaque nucléophile, par la tyrosine catalytique, du phosphate scissile

A.



B.

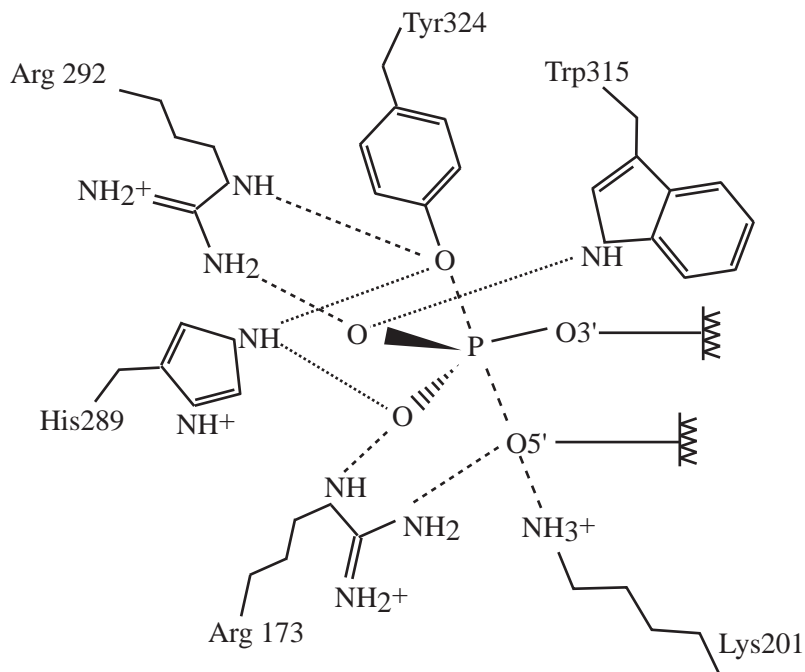


Figure 10. Réaction de coupure catalysée par les recombinaises à tyrosine.

A. La réaction consiste en une déprotonation du groupement hydroxyle de la tyrosine catalytique par une base générale puis par la protonation du groupement oxygène sortant de l'ADN par un acide général. Cette réaction implique un intermédiaire pentavalent du phosphate, où l'on peut voir que le transfert de la liaison phosphoryle se fait « en ligne » (Grindley *et al.*, 2006). **B.** Modèle de stabilisation du phosphate pentavalent par les acides aminés conservés de la recombinaise Cre. Les liaisons hydrogènes sont schématisées par des pointillés. La base générale correspondrait à l'histidine 289 (résidu H/K). L'acide général serait la lysine 201. Les trois autres acides aminés (R, R, H/W) par des liaison hydrogènes avec le phosphate scissile, aideraient au positionnement du phosphate et stabiliseraient l'intermédiaire pentavalent. D'après Gibb *et al.*, 2010.

situé à la jonction du bras de fixation et de la région centrale du site de recombinaison (Figure 10A). Les produits de cette réaction sont la formation d'une liaison 3' phosphotyrosyl qui lie de manière covalente la protéine à l'ADN et la libération d'un groupement 5'-OH (Figure 10A). Cette réaction est réversible, puisque le groupement 5'-OH ainsi libéré peut attaquer la liaison phosphotyrosyl ramenant le système à l'état initial. Cette réaction nécessite une base générale qui va déprotoner la tyrosine nucléophile, un acide général qui va protoner le groupe 5'O sortant de l'ADN, et la formation d'un intermédiaire pentavalent du phosphate (Figure 10A). Le rôle joué par les cinq autres résidus catalytiques, R-K-H/K-R-H/W, est encore controversé (Grindley *et al.*, 2006). Néanmoins, il en ressort un modèle proposé par Van Duyne pour la recombinase Cre qui pourrait être généralisé aux autres protéines de la famille. La lysine correspondrait à l'acide général et le candidat le plus probable pour jouer le rôle de base générale serait la première histidine. Les trois autres acides aminés, R, R et H/W, stabiliseraient l'intermédiaire pentavalent par des liaisons hydrogènes avec le phosphate scissile (Van Duyne, 2001). Récemment, l'obtention de la structure du site actif de la recombinase Cre où le phosphate scissile a été remplacé par un vanadate pentavalent (Gibb *et al.*, 2010), permet de proposer le modèle de stabilisation du phosphate pentavalent présenté figure 10B. Les mêmes auteurs ont également réalisé une étude de l'importance de chacun des acides aminés dans la catalyse de la réaction de recombinaison. Pour cela, ils ont construit une librairie de mutants du site catalytique où chaque résidu catalytique a été remplacé par les 19 autres acides aminés. Cette étude montre que la tyrosine et la lysine, et donc le nucléophile et l'acide général, sont essentiels à la catalyse, ils ne tolèrent pas ou très peu de substitutions. Les deux arginines sont plus tolérantes aux substitutions. Elles sont diamétralement opposées formant des liens hydrogènes avec le nucléophile et le groupement sortant, leurs rôles est donc inversé lors de la coupure et de la ligature (Figure 10B). Le tryptophane et l'histidine tolèrent un grand nombre de substitutions (Gibb *et al.*, 2010).

2.4. La réaction d'échange de brins

Dans la synapse de recombinaison, la coupure est effectuée par deux monomères diamétralement opposés (Guo *et al.*, 1997). La réaction d'échange de brins consiste en l'attaque, par les deux groupements 5'-OH libres, de la liaison 3' phosphotyrosyl du substrat partenaire. Pour ce faire, et pour s'assurer de l'homologie entre les deux ADN substrats, il est proposé un modèle de « *strand swapping isomerisation* ». C'est-à-dire que les 2 ou 3 bases adjacentes à la coupure vont se déshybrider du brin complémentaire et s'apparier aux bases

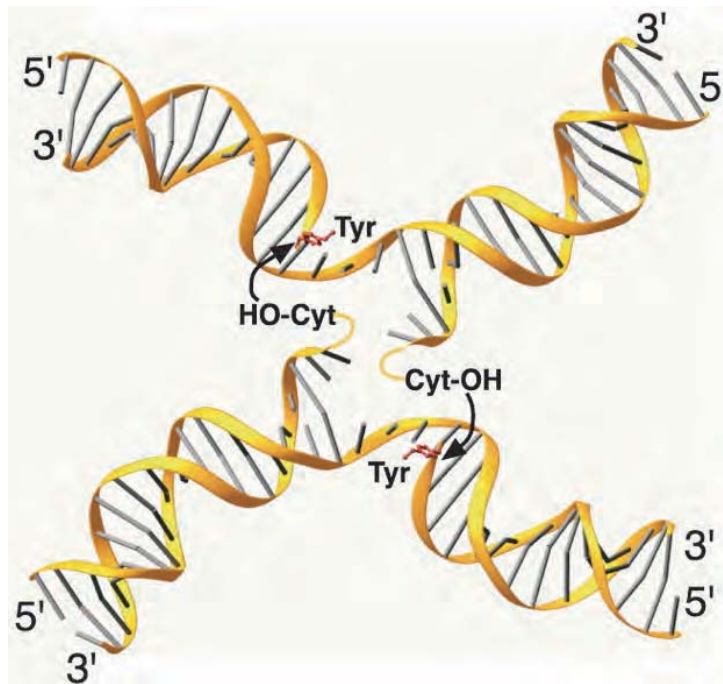


Figure 11. Structure de l'ADN après coupure par la recombinaise Cre.

La structure présentée ici est la même que l'intermédiaire réactionnel présenté figure 6B. Pour plus de clarté, les monomères de Cre ont été enlevés. L'ADN utilisé est un substrat suicide, c'est-à-dire un ADN qui possède une interruption ("*nick*") à quelques bases du phosphate scissile. L'attaque par la tyrosine catalytique de ce substrat a pour conséquence la diffusion des bases situées entre le "*nick*" et la coupure, ce qui piège la liaison covalente protéine-ADN. La tyrosine catalytique ainsi que les résidus en 5' manquant, sont indiqués. On remarque que les bases adjacentes à la coupure sont désappariées et dirigées vers le centre du complexe. La flèche schématise l'attaque nucléophile et ainsi le mouvement lors de l'échange de brins (Van Duyne, 2001).

complémentaires du substrat partenaire. En accord avec ce modèle, la structure d'un complexe où la recombinase Cre est liée de manière covalente à l'ADN révèle que les bases adjacentes à la coupure sont désappariées et dirigées vers le centre du complexe synaptique (Figure 11) (Van Duyne, 2001). La réaction de recombinaison ne nécessitant pas d'énergie extérieure au système, l'échange de brins dépendrait de la courbure de l'ADN au sein du complexe nucléoprotéique. En effet, si la courbure induite par les recombinases est opposée à la courbure intrinsèque de l'ADN (dépendante de la séquence nucléotidique), alors, lors de la coupure d'un brin du duplex d'ADN, les 2-3 bases adjacentes vont être propulsées vers le substrat partenaire. Ce transfert de brins conduisant à la formation de l'intermédiaire de la réaction, la jonction de Holliday, est couplé à une étape d'isomérisation.

La présence d'homologie entre les régions centrales des substrats partenaires, lors de l'étape d'hybridation précédant la ligature, est nécessaire pour les recombinases λ Int, Flp, Cre ou XerC/D. L'importance de cette homologie est appuyée par la mise en évidence, chez les bactéries multichromosomiques, de la séquence des sites de recombinaison *dif*, portés par les différents chromosomes (Val *et al.*, 2008 ; Carnoy et Roten, 2009). En effet, les sites portés par les chromosomes non homologues divergent seulement au niveau de la séquence de la région centrale. Cette différence de séquence est suffisante pour garantir que les différents chromosomes d'une même bactérie ne puissent pas fusionner par le biais de la recombinaison Xer. Cependant, la règle d'une homologie stricte n'est pas généralisable à la famille des recombinases à tyrosine (Rajeev *et al.*, 2009). En effet, il est à noter un certain nombre d'exceptions pour lesquelles l'hétérologie est tolérée (par exemple l'intégration du phage CTX) et dans le cas du transposon conjugatif NBU1 l'hétérologie stimulerait la recombinaison. Ces différents mécanismes qui nécessitent seulement une « micro homologie » font l'objet du paragraphe II.3.

2.5. Isomérisation et résolution de la jonction de Holliday

La résolution de la jonction de Holliday conduisant aux produits de recombinaison nécessite les mêmes réactions de coupure et d'échange de brins que précédemment, mais elles sont catalysées par le deuxième couple de recombinase. Une isomérisation du complexe est alors requise afin que les recombinases inactives lors des premières réactions de coupure et d'échange de brins deviennent actives, et inversement. Ainsi, la conformation de la jonction de Holliday entre l'état de coupure conduisant à sa formation et l'état permettant sa résolution nécessite une migration de branche qui varie en fonction de la longueur de la région centrale.

Elle est comprise entre 0-1, 1-2, et 2-3 pour des régions centrales de 6 (Cre), 7 (λ Int), et 8pb (Flp), respectivement (Voziyanov *et al.*, 1999). Une fois la jonction de Holliday résolue, le complexe nucléoprotéique est dissocié.

La réaction étant isoénergétique, la capacité de la jonction de Holliday à s'isomériser doit être influencée par les mêmes facteurs qui influencent la conformation du complexe synaptique initial (courbure intrinsèque de l'ADN, interactions entre monomères de recombinaisons et entre protéines et ADN). Notamment, la composition en bases de la région centrale définit une conformation préférentielle adoptée par la jonction de Holliday (Hallet *et al.*, 1999). Dans le cas du système Xer chromosomique, la conformation préférentielle correspond à la jonction de Holliday isomérisée, prête à être résolue en produits. L'isomérisation semble donc être programmée dans le complexe synaptique initial, c'est-à-dire que le complexe synaptique favoriserait le premier échange de brins qui conduit à la formation de la jonction de Holliday dans sa conformation « non-préférentielle ».

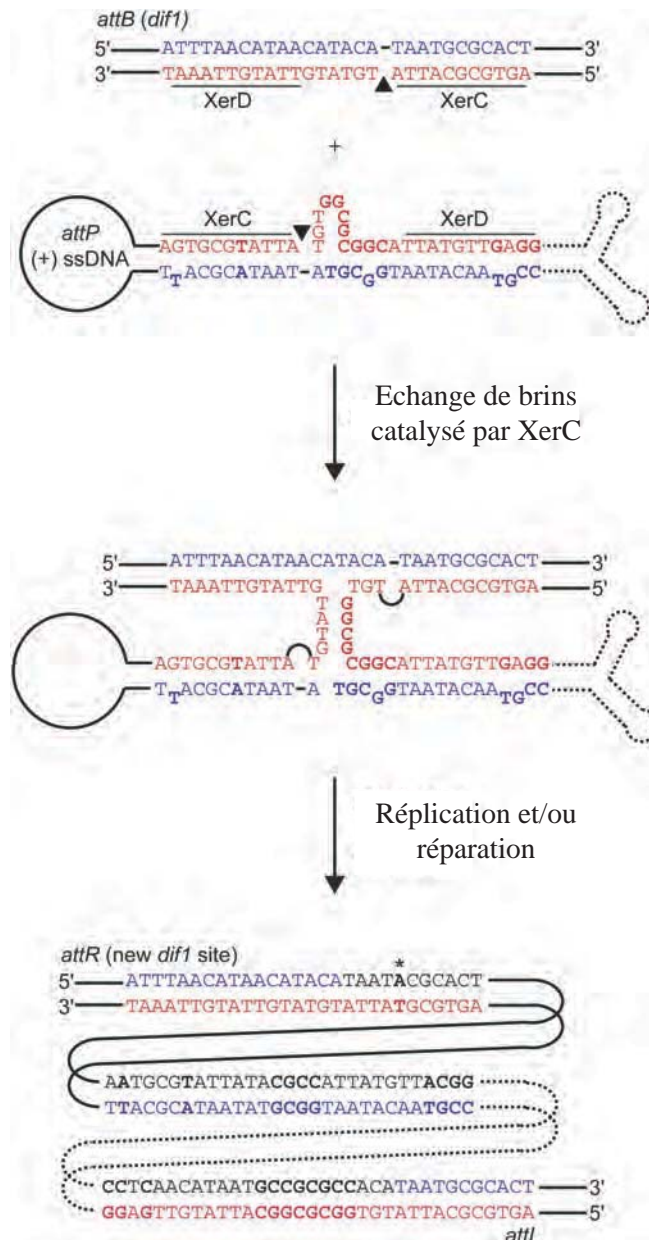


Figure 12 : Modèle de la réaction de recombinaison entre le site *attP* porté par le phage CTX et le site *attB* du chromosome de *Vibrio cholerae*.

Le brin positif de l'ADN phagique ((+) ssDNA) se structure pour former un site de recombinaison double brin (*attP*) similaire au site *dif1* (ou *attB*) bactérien. Pour chacun des sites le brin dit « supérieur » est représenté en rouge et le brin « inférieur » en bleu. Les bases qui diffèrent du site *attB* sont indiquées en gras sur le site *attP*. Les bras de fixation des recombinases XerC et XerD ainsi que le site de coupure par XerC sont également indiqués. La réaction débute par la coupure par XerC du brin supérieur, en amont des 3 bases homologues de la région centrale, et par l'échange de brins. La ligature est schématisée par des arcs sur l'intermédiaire réactionnel. La réaction se termine par la régénération d'un ADN double brin par des processus de réplication et/ou de réparation (bases indiquées en noir), ce qui encadre le prophage sur le génome bactérien de deux nouveaux sites *attL* et *attR*. Bien que différant d'une base (indiquée par une étoile), le site *attR* peut être utilisé par la bactérie comme le nouveau site de résolution des dimères de chromosome (Val *et al.*, 2005).

3. Les mécanismes réactionnels alternatifs

3.1 Intégration du phage CTX Φ

V. cholerae est une bactérie qui possède deux chromosomes et un système de recombinaison Xer homologue au système d'*E.coli* (Chapitre III). La résolution des dimères de chromosome s'effectue aux sites *dif1* et *dif2* portés par les chromosomes 1 et 2 respectivement. Le phage CTX détourne le système Xer chromosomique de son hôte, *V. cholerae*, pour s'intégrer dans son génome (Huber et Waldor, 2002 ; McLeod et Waldor, 2004). Les deux principaux variants du phage CTX, « classique » et « El Tor », ont été référencés selon le biotype de l'hôte dans lequel ils ont été identifiés. Pour les souches de *V. cholerae* « El Tor », la cible du phage CTX^{ET} est le site *dif1*. La particularité du mécanisme de recombinaison utilisé par le phage est qu'il fait intervenir de l'ADN simple brin. Le brin positif du génome phagique se structurerait de manière à former un site *attP* double brins, similaire au site *dif1* chromosomique bactérien (*attB*) (Val *et al.*, 2005). Le modèle de structure secondaire du brin positif est schématisé figure 12. Dans la région centrale, le brin supérieur du site *attP* possède 6 bases supplémentaires qui, ne pouvant s'apparier au brin inférieur, forment une boucle. Une telle structure dans les régions centrales d'un site synthétique *FRT* ou d'un site *dif* contenu dans une Jonction de Holliday a été montrée comme favorisant la coupure par la recombinase du brin possédant la boucle (Lee *et al.*, 1997 ; Arciszewska *et al.*, 2000). De plus, seulement 3 bases de la région centrale du site *attP* sont complémentaires au site *dif1* chromosomique. Cette similarité de séquence, nécessaire à l'échange de brins, est située à l'extrémité 3' du brin supérieur libérée après la coupure catalysée par XerC. En accord avec cela, la première réaction est catalysée par XerC qui coupe et échange la paire de brins supérieurs pour former la jonction de Holliday (Figure 12) (McLeod et Waldor, 2004 ; Val *et al.*, 2005). Bien que pour la réaction de recombinaison la présence de XerD soit indispensable, son activité catalytique ne l'est pas. Ainsi, la jonction de Holliday est résolue par les mécanismes bactériens de réplication et/ou de réparation (McLeod et Waldor, 2004 ; Val *et al.*, 2005), comme c'est le cas lors de la résolution des dimères de plasmide ColE1 (Paragraphe III.2). L'absence d'une deuxième réaction de coupure et d'échange de brins est une nécessité pour le phage puisqu'elle conduirait à la linéarisation du chromosome bactérien et donc à la mort de son hôte. Il apparaît donc que la présence d'une boucle sur le brin supérieur associé à la faible similarité de séquence de la région centrale

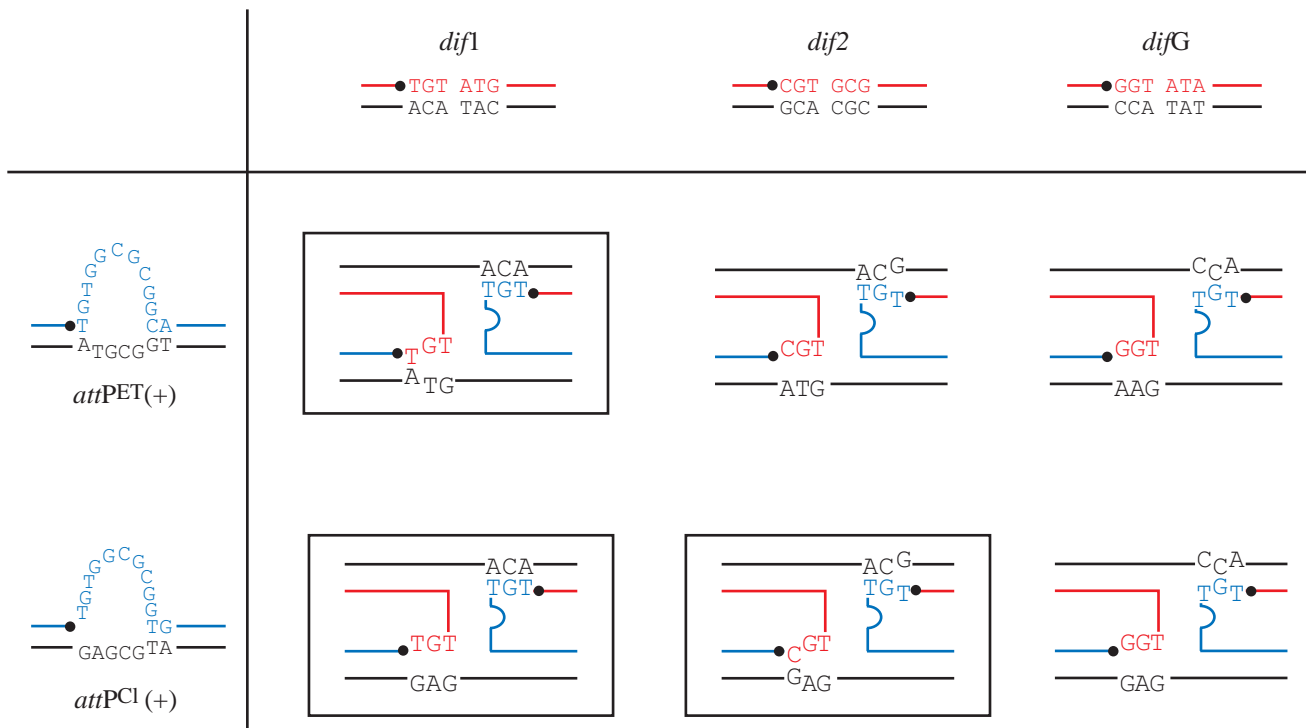


Figure 13 : La stabilité de l'échange de brins donne la spécificité d'intégration du phage CTX.

Schéma des appariements réalisés lors de l'échange de brins, après coupure catalysée par XerC, entre différents sites *dif* et *attP*. En rouge sont indiquées les séquences des régions centrales des sites *dif1*, *dif2* et *difG*. En bleu sont indiquées les séquences des régions centrales après structuration de l'ADN simple brin positif de CTX^{ET} et CTX^{Cl}, *attPET* (+) et *attPcl* (+), respectivement. La coupure par XerC est indiquée par un point noir sur les sites *dif* et *attP*. Les échanges de brins productifs, qui mènent à la ligature, sont encadrés. D'après Das *et al.*, 2010.

contrôle l'intégration du phage CTX en donnant la « directionnalité » de la réaction de recombinaison et en empêchant qu'un deuxième échange de brins puisse avoir lieu.

D'autre part, la similarité de séquence entre les régions centrales des sites *attP* et *dif* donne une spécificité d'intégration de CTX Φ . En effet, suivant la complémentarité des bases échangées après la coupure par XerC, il va y avoir une spécificité d'intégration au site *dif1* ou au site *dif2* (Das *et al.*, 2010). Ainsi, le phage CTX^{ET} possède, sur le brin échangé du site *attP* 3 bases complémentaires à la région centrale du site *dif1*, et sur l'autre brin aucune similarité de séquence avec le brin échangé du site *dif1* (Figure 13). Ceci permet la stabilisation d'un seul des deux échanges de brins, et une intégration efficace au site *dif1*. Cette réaction de recombinaison tolère donc les mésappariements sur un des deux brins échangés. En revanche, lorsque seulement deux bases sur un des deux brins sont complémentaires, la réaction n'a pas lieu. Ainsi, CTX Φ ^{ET} ne s'intègre pas au site *dif2*. Le phage CTX^{Class} s'intègre au niveau des deux sites de recombinaison. Il possède les 3 bases complémentaire au site *dif1*, comme dans le cas du phage CTX^{ET}, ce qui permet une recombinaison efficace. Cependant, il a la capacité de s'intégrer au site *dif2* puisqu'en plus des deux bases complémentaires sur un brin, le deuxième brin fait un appariement de bases avec le brin échangé (Figure 13). La réaction est moins efficace qu'avec le site *dif1*, probablement parce que les échanges de brins sont moins stables. De la même manière, certaines souches de *V. cholerae* possèdent un site *difG* dont la région centrale diffère avec les sites *attP* de CTX Φ ^{ET} et CTX Φ ^{Class}, et de ce fait elles ne peuvent recevoir le génome d'aucun de ces deux phages. La réciproque est également vraie puisque certains types de phages CTX ne peuvent s'intégrer ni au site *dif1*, ni au site *dif2* (Das *et al.*, 2010).

L'utilisation du système Xer ne semble pas être une caractéristique spécifique du phage CTX puisqu'il a été mis en évidence un certain nombre de phages filamenteux intégrés aux sites *dif* chez plusieurs espèces bactériennes (Huber et Waldor, 2002 ; Iida *et al.*, 2002 ; Campos *et al.*, 2003).

3.2 La capture de cassettes de gènes par les intégrons

Le terme « intégron » désigne une plateforme à laquelle sont associées des cassettes de gènes. Les cassettes sont des petites entités comprenant une phase ouverte de lecture, généralement sans promoteur associé, et un site de recombinaison *attC* (pour *attachment site associated with Cassettes*). Elles ont la capacité de s'intégrer dans une plateforme constituée

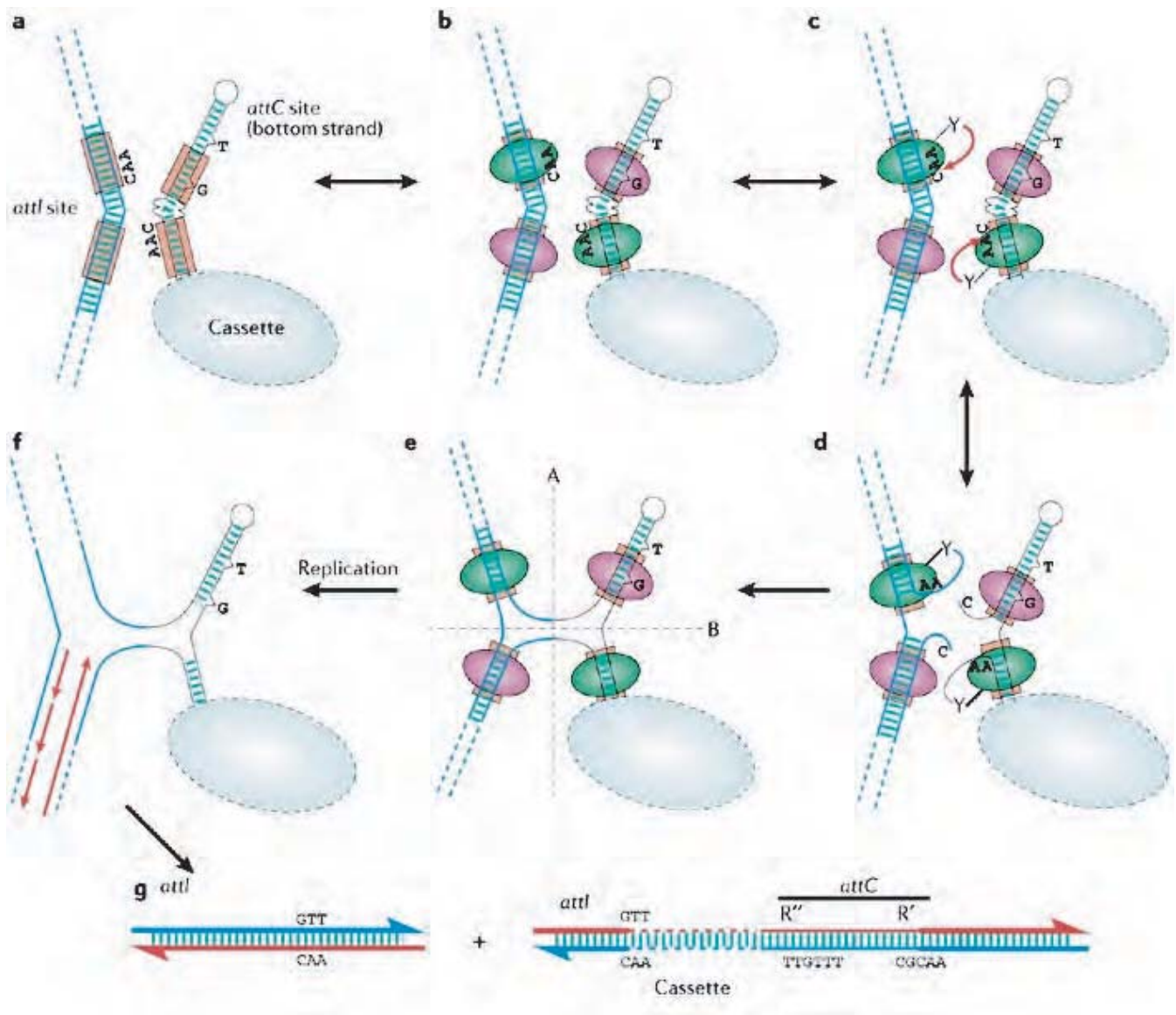


Figure 14. Modèle d'intégration de cassettes par les intégrons.

a. Ce modèle utilise un ADN simple brin, structuré de manière à former un site de recombinaison double brin *attC*. Les bras de fixation de la recombinase IntI sont représentés, pour les deux sites de recombinaison *attI* et *attC*, par des rectangles oranges. **b.** Fixation des quatre monomères d'IntI sur les sites cœurs. Les monomères verts correspondent aux sous-unités actives alors que les monomères en rose correspondent aux recombinases dans leur conformation inactive. **c.** Attaque de l'ADN par la tyrosine catalytique entre les nucléotides C et A du triplet très conservé CAA. **d.** Formation d'une liaison covalente 3' phosphotyrosine et libération d'un groupement hydroxyle en 5'. **e.** Attaque de la liaison phosphotyrosine de l'ADN partenaire par le groupement 5'-OH et formation de la jonction de Holliday. La résolution de la jonction de Holliday suivant l'axe A inverse la réaction de recombinaison pour revenir aux substrats initiaux et la résolution suivant l'axe B conduit à la formation d'une seule molécule linéaire. Pour que la réaction de recombinaison soit productive, la résolution nécessite une étape de réplication afin de générer le produit intégré (**f,g**). Les lignes en rouge correspondent au brin d'ADN nouvellement synthétisé (Mazel, 2006).

d'un gène codant pour une recombinase à tyrosine, *intI*, d'un site de recombinaison, *attI*, et de deux promoteurs en orientations inverses, l'un dédié à l'expression du gène *intI*, et l'autre dédié à l'expression des gènes des cassettes intégrées (pour revue Mazel, 2006).

Utilisant un mécanisme d'intégration similaire à celui du phage CTX, la capture de cassettes de gènes implique un ADN substrat sous sa forme simple brin. Le site *attI* de la plateforme est un site de recombinaison classique, alors que les sites *attC* portés par les cassettes de gènes varient en séquences et en tailles (Figure 15). Ainsi, la réaction de recombinaison implique deux sites hétérologues au niveau des bras de fixation et des régions centrales. Il a été mis en évidence que c'est le brin inférieur du site *attC* qui est le substrat de la réaction de recombinaison (Johansson *et al.*, 2004 ; Bouvier *et al.*, 2005). Il se structure de manière à former un ADN double brin ressemblant à un site canonique. La réaction de recombinaison consiste en une seule réaction de coupure et d'échange de brins conduisant à la formation de la jonction de Holliday (Figure 14). En effet, comme dans le cas de l'intégration du phage CTX, une réaction de recombinaison complète conduirait à linéariser la molécule d'ADN. L'intermédiaire de la réaction serait alors résolu par les processus de réplication pour permettre de générer le site *attI* et le produit intégré (Bouvier *et al.*, 2005).

La coupure s'effectue entre les bases C et A de la séquence très conservée CAA, contenue dans la boîte R' (Figure 15). Il a été récemment mis en évidence par des tests d'intégration *in vivo*, que la nécessité d'homologie entre les deux sites partenaires, *attC* et *attI*, porte seulement sur le premier nucléotide (Frumerie *et al.*, 2010). Après coupure, ce nucléotide (C) porte le groupement hydroxyle qui attaque la liaison phosphotyrosyl de l'ADN partenaire. C'est donc le premier nucléotide du brin d'ADN qui va être échangé, ce qui l'implique dans l'étape d'appariement avec les bases complémentaires du substrat partenaire (Paragraphe II.2.4). Il apparaît ainsi que, dans le cas des réactions de recombinaison catalysées par les intégrons, une homologie d'une seule base, adjacente au site de coupure, est suffisante pour réaliser l'échange de brins (Frumerie *et al.*, 2010).

Bien que les sites *attC* soient très variables en séquences, la structure secondaire formée par le brin supérieur est très conservée (Figure 15). Ainsi, alors que la reconnaissance du site *attI* par la recombinase IntI est dépendante de la séquence (Figure 15), la reconnaissance des sites *attC* est dépendante d'éléments structuraux. Ceci a pu être mis en évidence par des études structurales (MacDonald *et al.*, 2006 ; Demarre *et al.*, 2007) ainsi que par des expériences *in vitro* (Johansson *et al.*, 2004) et *in vivo* (Bouvier *et al.*, 2009). Trois éléments structuraux sont conservés : la région centrale non appariée (UCS pour *Unpaired Central Spacer*), les deux ou trois bases extrudées contenues dans la tige L (EHB pour *Extra-*

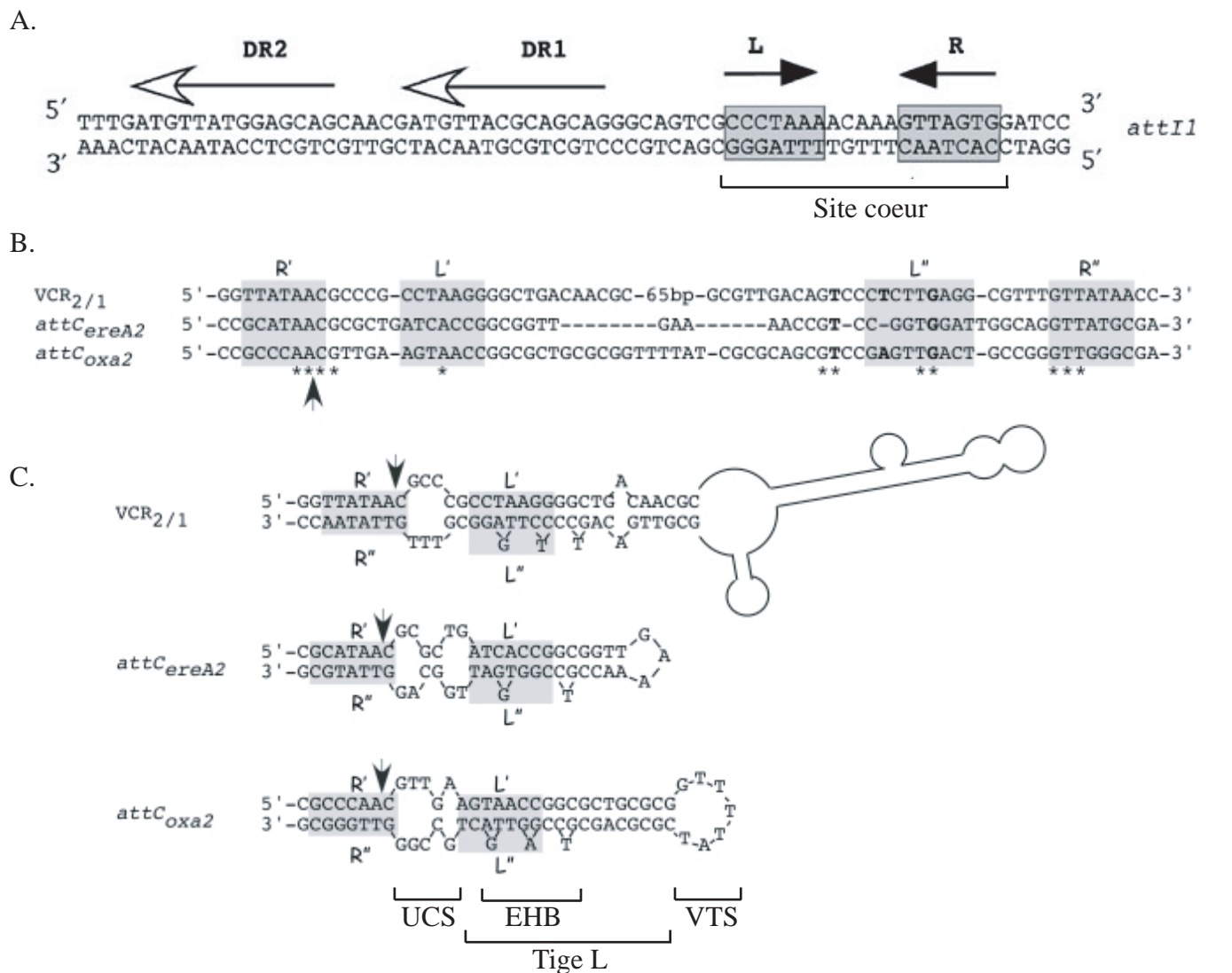


Figure 15. Sites de recombinaison des intégrons.

A. Séquence du site *attI1* double brin. Le site cœur est indiqué et le site de coupure est montré par une flèche. Les bras de fixation de la recombinase, L et R sont indiqués par des flèches noires et des rectangles grisés. Les séquences répétées DR1 et DR2, indiquées par des flèches blanches en orientation directe, sont des sites de fixation putatifs de la recombinase IntI1. **B.** Alignement des séquences des brins inférieurs pour trois sites, VCR_{2/1} (site *attC* des cassettes du superintégron de *V.cholerae*), *attC_{ereA2}* (site *attC* des cassettes portant le gène *ereA2*) et *attC_{oxa2}* (site *attC* des cassettes possédant le gène *oxa2*). **C.** Structure secondaire des brins inférieurs des trois sites *attC*. Les séquences inversées répétées L' et L'', R' et R'' sont indiquées par des rectangles grisés. Les astérisques montrent les nucléotides conservés entre les sites *attC*. Les lettres en gras correspondent aux 2 ou 3 bases extrudées contenues dans la tige L (EHB pour *Extra-Helical Bases*). Les deux autres éléments structuraux conservés, la région centrale non appariée (UCS pour *Unpaired Central Spacer*) et la structure terminale variable formée en aval de la tige L (VTS pour *Variable Terminal Structure*) sont également indiqués (Bouvier *et al.*, 2005 ; Bouvier *et al.*, 2009).

Helical Bases) et la structure terminale variable formée en aval de la tige L (VTS pour *Variable Terminal Structure*) (Figure 15). L'étude de ces différents éléments structuraux lors d'expériences d'intégration *in vivo* a permis de mettre en évidence l'importance des éléments UCS et EHB dans le contrôle de la réaction de recombinaison (Bouvier *et al.*, 2009). L'élément EHB impliqué dans des interactions spécifiques avec l'intégrase (MacDonald *et al.*, 2006), et particulièrement la base très conservée G, est essentiel dans la sélection de brin. Il assure que les cassettes soient intégrées dans la bonne orientation permettant l'expression des gènes qu'elles contiennent. L'élément UCS, qui est asymétrique dans sa composition nucléotidique, est nécessaire à l'assemblage du complexe synaptique, probablement par la courbure de l'ADN qu'il induit. D'autre part, cette structure formée de bases non appariées empêcherait que la réaction d'échange de brins inverse ait lieu, assurant ainsi la directionnalité de la réaction de recombinaison conduisant à la formation de la jonction de Holliday (Bouvier *et al.*, 2009).

3.3 Les transposons conjugatifs

Les transposons conjugatifs, également appelés ICE (pour *Integrating Conjugative Elements*), forment une grande famille d'éléments aux caractéristiques variées (pour revues (Burrus *et al.*, 2002 ; Burrus et Waldor, 2004). Ils sont définis par leur capacité à s'intégrer dans le chromosome bactérien par recombinaison spécifique de site et, lorsque les conditions sont appropriées, s'excisent du génome sous forme d'un intermédiaire circulaire puis sont transférés dans une cellule réceptrice par conjugaison.

Le transposon conjugatif CTnDOT s'intègre dans le chromosome des Bactéroïdes au niveau de divers sites *attB* (Cheng *et al.*, 2000). La recombinaison s'effectue avec le site *attDOT*, formé par la circularisation du transposon lors de son excision, et est catalysée par la recombinase IntDOT. Les deux sites possèdent une région centrale de 7pb dont deux bases seulement sont similaires (Figure 16A). Il a été mis en évidence *in vitro* que les 2pb d'homologie sont nécessaire à la catalyse de la première réaction de coupure et d'échange de brins (Malanowska *et al.*, 2007). La nature des bases n'est pas importante tant qu'elles sont identiques sur les deux sites partenaires (Malanowska *et al.*, 2007). De plus, ces 2pb attenantes au site de coupure, contrôlent l'ordre d'échange de brins (Laprise *et al.*, 2010). La réaction de recombinaison se poursuit en tolérant l'hétérologie, par la coupure et l'échange de la deuxième paire de brins au niveau des séquences non homologues. Ainsi, les étapes d'excision et d'intégration impliquent la formation d'hétéroduplex de 5pb qui sont résolus

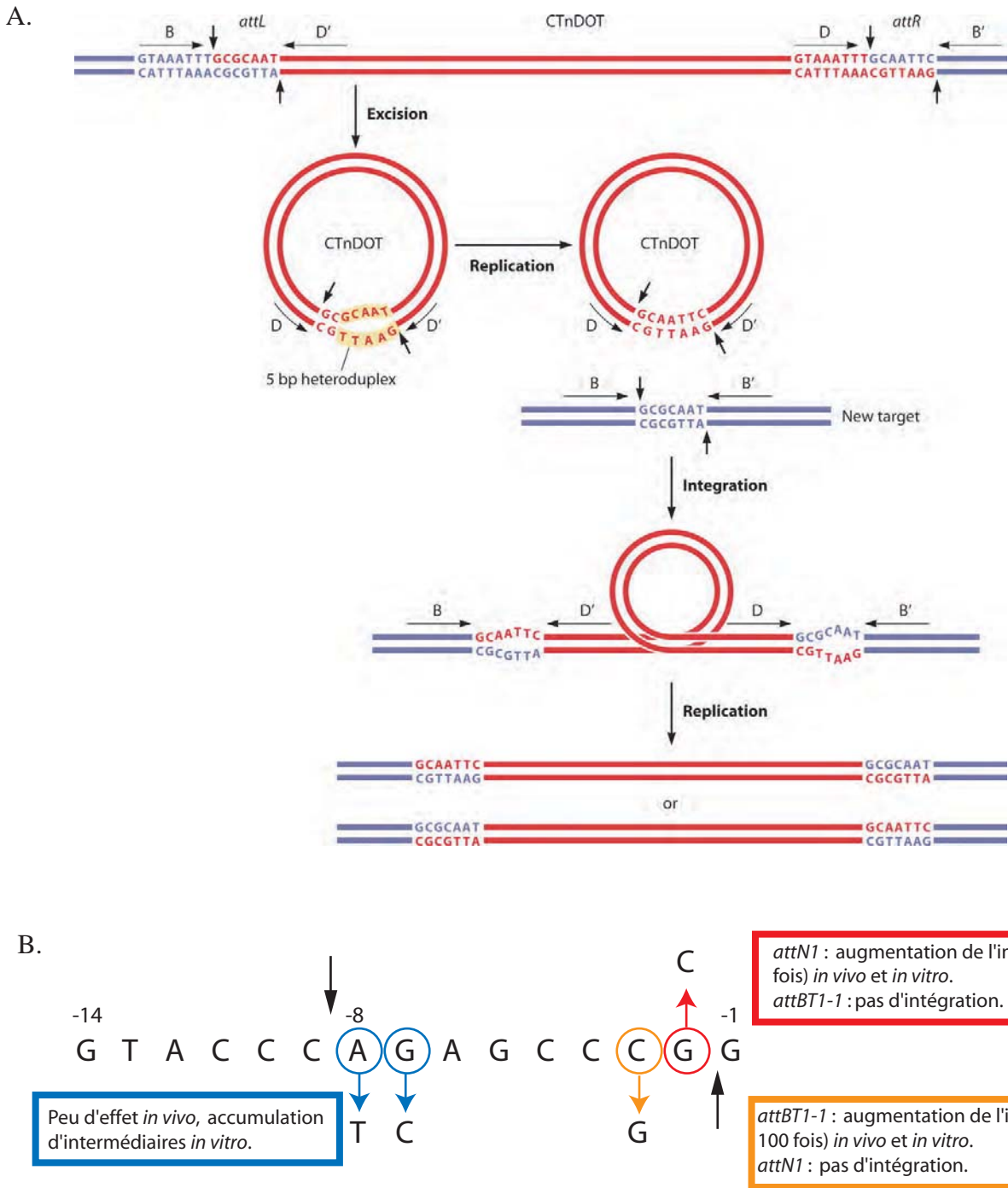


Figure 16. Intégration et excision des transposons conjugatifs CTnDOT et NBU1.

A. Modèle d'excision et d'intégration du transposon conjugatif CTnDOT. D et D' correspondent aux sites de fixation de la recombinase IntDOT sur le transposon CTnDOT (en rouge), B et B' aux sites de fixation sur le chromosome bactérien (en bleu). Les sites de coupe de part et d'autre de la région centrale de 7pb sont indiqués par des flèches verticales. Le transposon s'excise du génome de l'hôte pour former un intermédiaire circulaire dont 5pb, sur les 7pb de la région centrale, forment un hétéroduplex. La résolution de l'hétéroduplex est réalisée après conjugaison, par la synthèse du brin complémentaire dans la cellule receveuse. L'intégration du transposon dans sa nouvelle cible, au niveau d'un site *attB*, est réalisée de la même manière que pour l'excision, par la coupe et l'échange de brin de part et d'autre de la région centrale. La recombinaison mène également à la formation d'un hétéroduplex de 5pb, au niveau des sites *attL* et *attR* nouvellement formés. Ce sont alors les mécanismes de répllication et/ou de réparation de la cellule hôte qui vont résoudre les mésappariements (Rajeev *et al.*, 2009). **B.** Séquence de 14pb conservée entre les sites *attN1* du transposon NBU1 et *attBT1-1* bactérien. Les sites de coupe par la recombinase IntN1 sont montrés par des flèches verticales. La position et la nature des mutations effectuées dans la région centrale, ainsi que les effets de ces mutations sur l'efficacité de recombinaison *in vivo* et *in vitro*, sont indiqués (Rajeev *et al.*, 2009).

dans les cellules par les mécanismes de réplication et/ou de réparation de l'ADN (Figure 16A). D'autre part, il a été démontré récemment que deux sites partenaires possédant une homologie d'une seule base, localisée de manière adjacente à la coupure, sont des substrats de la recombinaison. Cependant, cette réaction est bien moins efficace que lorsque le dinucléotide homologue est présent (Laprise *et al.*, 2010). Ainsi, de la même manière que pour les intégrons, il apparaît pour la réaction de recombinaison réalisée par le transposon CTnDOT, qu'une homologie au niveau de la base adjacente à la coupure soit suffisante pour réaliser l'échange de brin.

Le modèle d'excision et de transfert du transposon conjugatif NBU1 est similaire à celui proposé pour CTnDOT (Figure 16A). Cependant, la réaction d'intégration est réalisée au niveau d'un site chromosomique *attBTI-1* qui possède 14pb homologues au site *attN1* porté par le transposon. L'intégrase IntN1 réalise les coupures et échanges de brins de part et d'autre de la région centrale de 7pb. Bien que la réaction de recombinaison soit normalement réalisée au niveau de séquences identiques pour les deux sites de recombinaison, il a été mis en évidence *in vitro* et *in vivo* que l'hétérologie stimule le premier échange de brin. En effet, des mésappariements aux positions -2 et -3 du site de coupure du brin supérieur augmentent considérablement l'efficacité de recombinaison (Figure 16B) (Schmidt *et al.*, 2006 ; Rajeev *et al.*, 2007). Le deuxième échange de brin en revanche ne tolère pas les mésappariements (Rajeev *et al.*, 2007). Il semble ainsi que le transposon conjugatif NBU1 ait une sensibilité inverse aux systèmes décrits précédemment. En effet, la similarité de séquence est nécessaire pour réaliser la coupure et l'échange de la deuxième paire de brins, et l'hétérologie au niveau des bases adjacentes à la première coupure apparaît être tolérée puisque les deux mutations indiquées figure 16B stimulent considérablement la réaction de recombinaison.

	Bras XerC	Région centrale	Bras XerD
<i>dif</i>	GGTGCGCATAA CCACGCGTATT	TGTATA ACATAT	TTATGTTAAAT AATACAATTTA
<i>cer</i>	GGTGCGTACAA CCACGCGATGTT	TTAAGGGA AATTCCCT	TTATGGTAAAT AATACCATTTA
<i>psi</i>	GGTGCGCGCAA CCACGCGCGTT	GATCCA CTAGGT	TTATGTTAAAC AATACAATTTG

Figure 17. Séquences de sites coeurs reconnus par les recombinaisons XerC et XerD d'*E. coli*.

Le site *dif* chromosomique et les sites *cer* et *psi* plasmidiques diffèrent principalement au niveau de la longueur et de la séquence de la région centrale. Les bras de fixation de XerC et XerD sont encadrés en rouge et en gris, respectivement. Les bases conservées pour chacun des bras de fixation sont indiquées en gras.

III. Le système Xer d'*E. coli*

Le système Xer est impliqué dans la ségrégation des réplicons, en résolvant les formes dimériques des chromosomes en monomères et en permettant la résolution des dimères de plasmides à haut nombre de copies. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe II.3.1, il est également utilisé par plusieurs phages filamenteux afin d'intégrer leur génome dans le chromosome de leur hôte. Suivant le rôle biologique dans lequel il est employé, le système Xer utilise un mécanisme de recombinaison et des facteurs accessoires différents. En effet, nous verrons que chez *E. coli* la résolution des dimères de plasmides requiert des séquences et des protéines accessoires, et que la résolution des dimères de chromosomes nécessite la protéine multifonctionnelle FtsK.

1. Les recombinases et leurs sites

Bien qu'il ne soit pas le seul, l'originalité du système Xer tient dans le fait de faire intervenir deux recombinases différentes XerC et XerD (pour *chromosomally encoded recombinase*) de 298 acides aminés chacune. Elles partagent 37% d'identité de séquence en acides aminés (Blakely *et al.*, 1993), ce qui est considérable pour la famille des recombinases à tyrosine. De ce fait, il a été proposé qu'une duplication de gène serait à l'origine de l'utilisation de deux recombinases différents par le système Xer. XerC et XerD agissent sur différents sites qui varient en séquence et en longueur de leur région centrale (Figures 3 et 17). Comme nous l'avons vu précédemment, les sites de recombinaison sont constitués de deux bras de fixation des recombinases de 11pb, encadrant une région centrale variant de 6 à 8pb. Il a été mis en évidence que les recombinases se fixent de manière coopérative sur leur site et que XerD a une meilleure affinité pour son bras de fixation que XerC pour le sien (Blakely *et al.*, 1993 ; (Blakely et Sherratt, 1996a). Cependant, comme nous allons le voir dans les paragraphes suivants, la réaction de recombinaison catalysée au niveau de chacun de ces sites est différente. Ceci a permis de mettre en évidence l'importance de la séquence et de la taille de la région centrale, ainsi que celle de l'affinité des recombinases pour leur bras de fixation, dans le contrôle de la réaction de recombinaison (Blake *et al.*, 1997 ; Arciszewska *et al.*, 2000 ; Colloms *et al.*, 1996 ; Capiiaux *et al.*, 2002). Il apparaît ainsi que le système Xer utilise des sites de recombinaison différents, possédant leurs caractéristiques propres, en fonction du rôle biologique dans lequel il est impliqué. Un niveau de contrôle supplémentaire

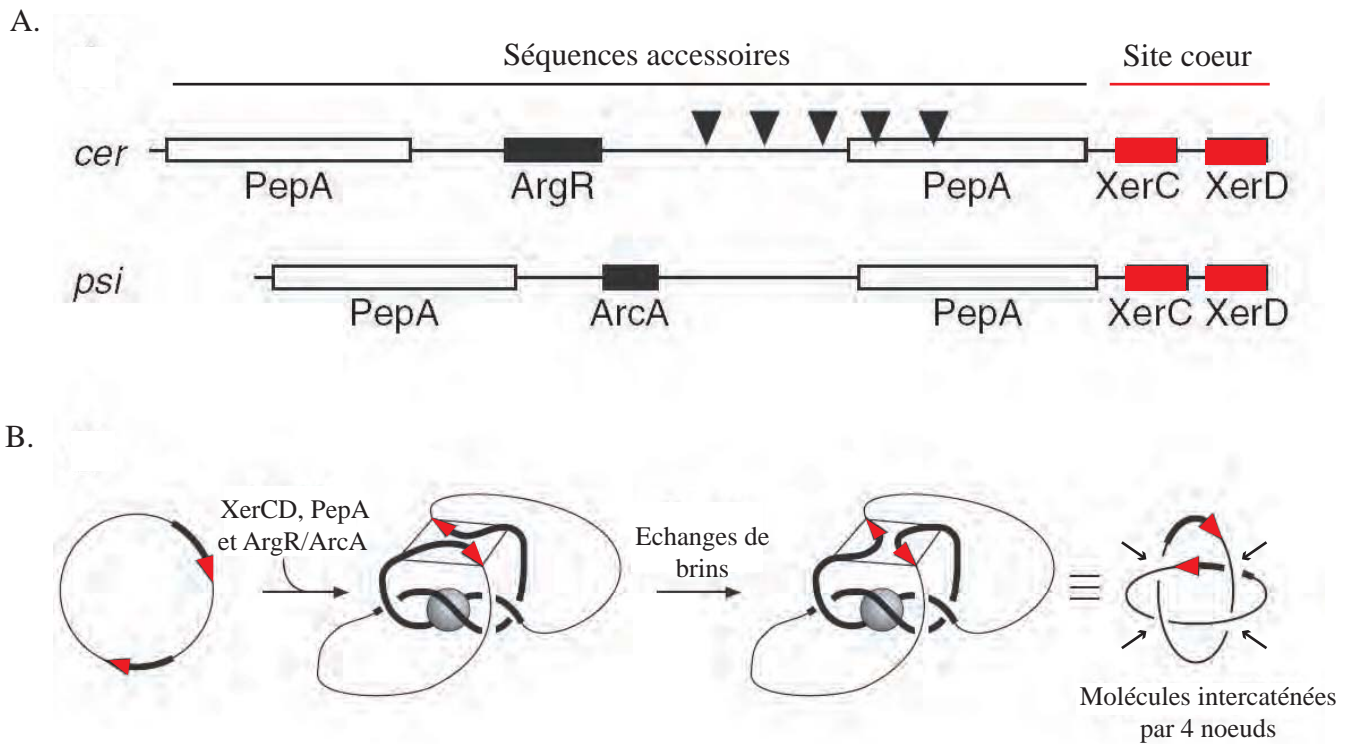


Figure 18. Recombinaison Xer aux sites *cer* et *psi*.

A. Structure des sites de recombinaison. Les bras de fixation des recombinases XerC et XerD contenus dans le site cœur sont représentés par des rectangles rouges. Dans les séquences accessoires, les sites de fixation des protéines ArgR et ArcA sont schématisés par des rectangles noirs. Les sites de fixation supposés de PepA, déduits des expériences d’empreintes à la DNaseI (Alén *et al.*, 1997), sont représentés par des rectangles blancs. Les flèches noires sur *cer* indiquent 5 sites hypersensibles à la DNaseI, suggérant à ce niveau une courbure de l’ADN induite par PepA.

B. Topologie de la réaction de recombinaison à *psi*. Les sites cœurs sont représentés par des triangles rouges et les séquences accessoires par un trait noir épais. La formation du complexe synaptique dictée par PepA, piège un nombre défini de croisements d’ADN et permet le rapprochement des deux sites cœurs. Les réactions successives d’échanges de brins catalysées par XerC puis XerD conduisent à formation de deux molécules circulaires enchaînées par 4 nœuds (indiqués par des flèches) (Reijns *et al.*, 2005).

vient également de l'utilisation de deux recombinaisons différentes qui assurent que les deux échanges de brins soient sous un contrôle différent.

2. La résolution des dimères de plasmide

La multimérisation des plasmides à haut nombre de copies, principalement causée par des événements de recombinaison homologue, réduit le nombre de molécules de plasmide dans la cellule ce qui entraîne un défaut de ségrégation lors de la division cellulaire (Summers *et al.*, 1993). Pour de nombreux plasmides la recombinaison spécifique de site Xer, en résolvant les formes dimériques en monomères, est un des mécanismes assurant leur ségrégation.

La recombinaison Xer plasmidique nécessite des sites et des protéines accessoires qui forment ce que l'on appelle un filtre topologique, dirigeant la formation d'un complexe synaptique défini. La géométrie précise du complexe synaptique implique qu'il ne puisse se former que lorsque deux sites sont placés en répétition directe sur une molécule circulaire superenroulée. Cette nécessité donne une directionnalité à la réaction de recombinaison et assure une recombinaison intramoléculaire, empêchant ainsi les événements de recombinaison conduisant à la formation de dimères.

Les mécanismes de résolution des dimères de plasmides les mieux étudiés sont ceux des plasmides ColE1 et pSC101, dont les sites de recombinaison sont *cer* (Summers et Sherratt, 1984) et *psi* (Cornet *et al.*, 1994), respectivement. Les sites de recombinaison sont constitués d'une région cœur de 30pb (*cer*) et 28pb (*psi*) (Figure 17) et de séquences accessoires de 178pb et de 158pb respectivement, localisées près du bras de fixation de XerC (Figure 18). Les protéines accessoires, PepA et ArgA pour *cer* et PepA et ArcA pour *psi* jouent seulement un rôle architectural. Ce sont des facteurs de transcription qui possèdent des propriétés de fixation spécifique à l'ADN. ArgR est un hexamère qui reconnaît une séquence spécifique de 18pb appelée « boîte ArgR ». PepA se lie également à l'ADN sous forme d'hexamère et rapproche les séquences accessoires de *cer* de part et d'autre du site de fixation d'ArgR. Il n'est pas encore défini si un seul ou deux hexamères de PepA et ArgR sont impliqués dans le système. ArcA, sous sa forme phosphorylée, a un rôle sur *psi* similaire à celui d'ArgR sur *cer*. L'absence des protéines ArcA et ArgR peut être compensée *in vitro* par une augmentation de la concentration en PepA (Colloms *et al.*, 1996 ; Colloms *et al.*, 1998). De plus, les produits de recombinaison obtenus en absence de ArcA ou de ArgR ont la même

topologie que lorsqu'elles sont présentes, suggérant que leur rôle est de stabiliser le complexe nucléoprotéique dont la conformation est dictée principalement par PepA (Gourlay et Colloms, 2004). La topologie précise des produits de recombinaison permet de définir la géométrie du complexe de recombinaison (Colloms *et al.*, 1997). Ainsi, des modèles de recombinaison aux sites *cer* (Reijns *et al.*, 2005) et *psi* (Bregu *et al.*, 2002) ont été proposés.

La recombinaison au site *cer* est catalysée par XerC pour former une jonction de Holliday. Cet intermédiaire est alors résolu par des processus cellulaires indépendants de l'activité catalytique des recombinases XerC et XerD (Colloms *et al.*, 1996). L'incapacité du système à réaliser la deuxième paire d'échange de brins serait due à la longueur et à la séquence de la région centrale du site *cer* (Blake *et al.*, 1997 ; Colloms *et al.*, 1996). La recombinaison à *psi* est catalysée par XerC puis la jonction de Holliday est résolue par XerD (Colloms *et al.*, 1996) (Figure 18). L'ordre d'échange de brins serait dépendant de l'orientation du site par rapport aux séquences accessoires. En effet, lorsque l'orientation du site par rapport aux séquences accessoires est inversée, c'est-à-dire que la bras de fixation de XerD est adjacent aux séquences accessoires, les produits de recombinaisons obtenus sont les mêmes, et la première coupure est majoritairement catalysée par XerD (Bregu *et al.*, 2002).

En plus de rapprocher les sites partenaires, les protéines accessoires, par la topologie qu'elles imposent, permettent d'activer les recombinases indépendamment des interactions recombinases/recombinases ou protéines accessoires/recombinases (Gourlay et Colloms, 2004). Ceci a pu être mis en évidence par l'utilisation de la recombinase Cre qui devient dépendante de PepA lorsqu'elle porte des mutations altérant l'interaction entre monomères par l'échange d'hélices C-terminales. Ceci est en accord avec le fait que XerC et XerD sont inactives sur les sites cœurs *psi* et *cer* en absence des protéines et/ou des sites accessoires (Blake *et al.*, 1997 ; Bregu *et al.*, 2002 ; Alén *et al.*, 1997) et suggère que le complexe synaptique formé des sites cœurs et des recombinases n'est pas productif. Il a été proposé que l'inactivité des recombinases sur les sites cœur *psi* et *cer* soit due à l'affinité réduite des protéines pour les bras de fixation (Blake *et al.*, 1997) et/ou à la longueur et à la séquence de la région centrale (Colloms *et al.*, 1996 ; Blakely et Sherratt, 1996a). L'utilisation de tels sites apparaît donc être un contrôle efficace du système puisque le complexe de recombinaison ne peut se former qu'en présence des protéines accessoires qui confèrent une architecture précise, possible seulement dans le contexte d'une molécule dimérique.

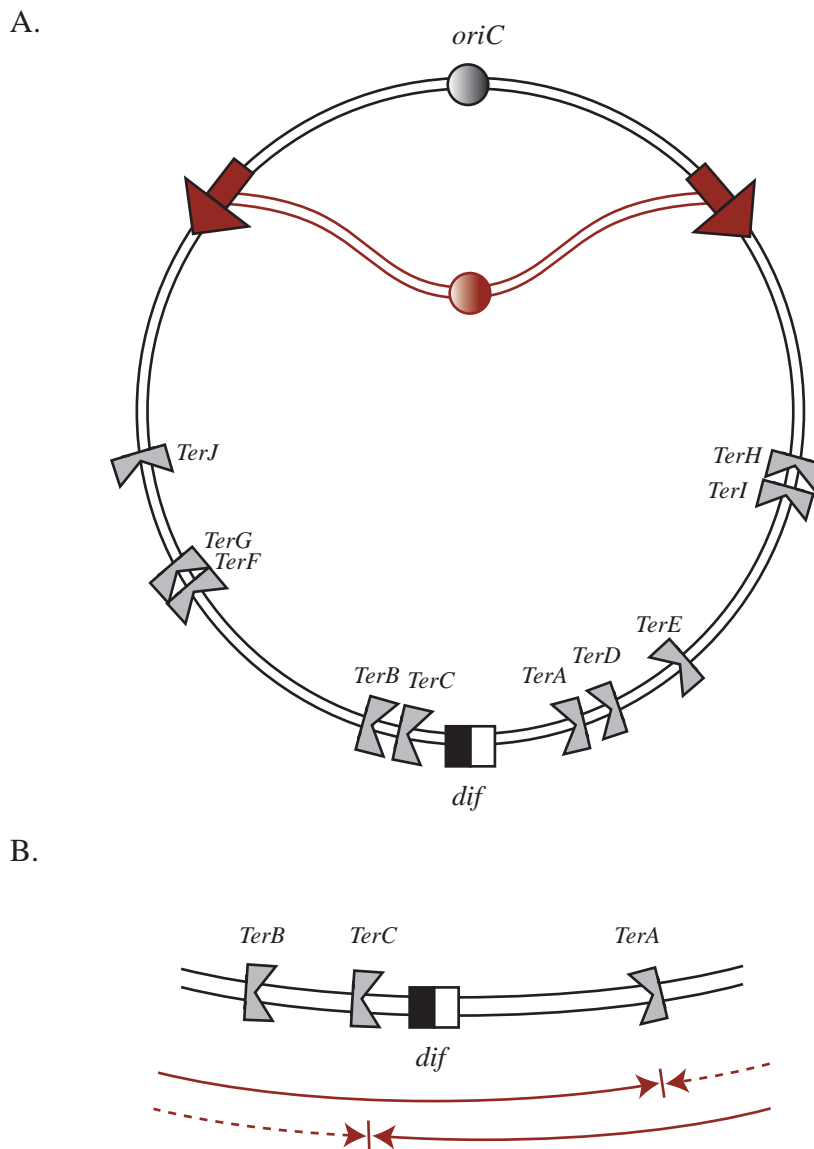


Figure 19. Réplication du chromosome d'*E.coli*.

A. La réplication s'initie au site unique *oriC*, représenté par une sphère. Les deux fourches de réplication, schématisées par des flèches, progressent de manière bidirectionnelle jusqu'à leur rencontre dans la région opposée à *oriC*, le terminus de réplication. Cette région contient un grand nombre de terminateur de réplication, les sites *Ter* (*TerA-TerJ*). Les sites *Ter* ont un orientation opposée de part et d'autre du site *dif* (schématisé par un rectangle noir et blanc), formant ainsi deux groupes, chacun dédié à l'arrêt d'une fourche de réplication. **B.** L'orientation des sites *Ter* délimite un piège, « *replication fork traps* », où se termine la réplication. Les flèches pleines représentent les premières fourches de réplication (une dans chaque orientation) arrêtées par les sites *Ter*, et les flèches en pointillés représentent les secondes fourches arrivées. Suivant la durée de réplication de chacune des fourches, la réplication s'achève au niveau du site *TerA* ou *TerC* (d'après Duggin *et al.*, 2008).

3. La résolution des dimères de chromosome

3.1. La ségrégation des chromosomes et FtsK

L'information génétique peut être portée par les bactéries sous différentes formes, un chromosome unique ou plusieurs chromosomes, qui peuvent être linéaires ou circulaires. Cependant la majorité des bactéries connues possèdent un seul chromosome circulaire comme la bactérie modèle *E. coli*. La réplication du chromosome d'*E. coli* est initiée à un site unique *oriC* et se fait de manière bidirectionnelle par l'action de deux fourches de réplication qui vont, de manière symétrique et dans des orientations opposées, dupliquer progressivement les deux bras du chromosome jusqu'à la région de terminaison localisée à l'opposé de *oriC* (Figure 19). La région de terminaison de la réplication contient des terminateurs de réplication, les sites *Ter* (Pour revue Duggin *et al.*, 2008). Ils sont orientés sur le chromosome et reconnus par la protéine Tus de manière à ce que les complexes *Ter/Tus* stoppent la progression des deux fourches de réplication. Ils forment ainsi un piège, appelé « *replication fork traps* », où vont se rencontrer les fourches de réplication (Figure 19B). Afin d'être répartis équitablement dans les deux cellules filles, les chromosomes nouvellement répliqués doivent être séparés l'un de l'autre. Cependant, deux événements peuvent lier les chromosomes frères, soit par des liens d'intercaténation, soit en une molécule unique, empêchant une ségrégation correcte.

3.1.1 Les liens d'intercaténation

L'ouverture de la double hélice d'un ADN circulaire par les mécanismes de transcription, de réplication ou de recombinaison engendre des contraintes topologiques (pour revue Wang, 2002). Ainsi, lors de la réplication des 4,6 Mb du chromosome d'*E. coli*, de nombreux liens topologiques sont créés et pour la grande majorité résolus au cours de la réplication (Wang *et al.*, 2008). Cependant, à la fin de la réplication, les chromosomes frères restent enchaînés l'un à l'autre, on parle de caténats ou de lien d'intercaténation. La Topoisomérase IV est l'enzyme dédiée à décaténer les chromosomes (Adams *et al.*, 1992). C'est un hétérotétramère constitué d'un dimère de ParE et d'un dimère de ParC (Peng et Mariani, 1993), dont l'activité est régulée dans le temps et l'espace. Il est proposé que la sous-unité ParE soit libre dans le cytoplasme et que la sous-unité ParC soit associée à la

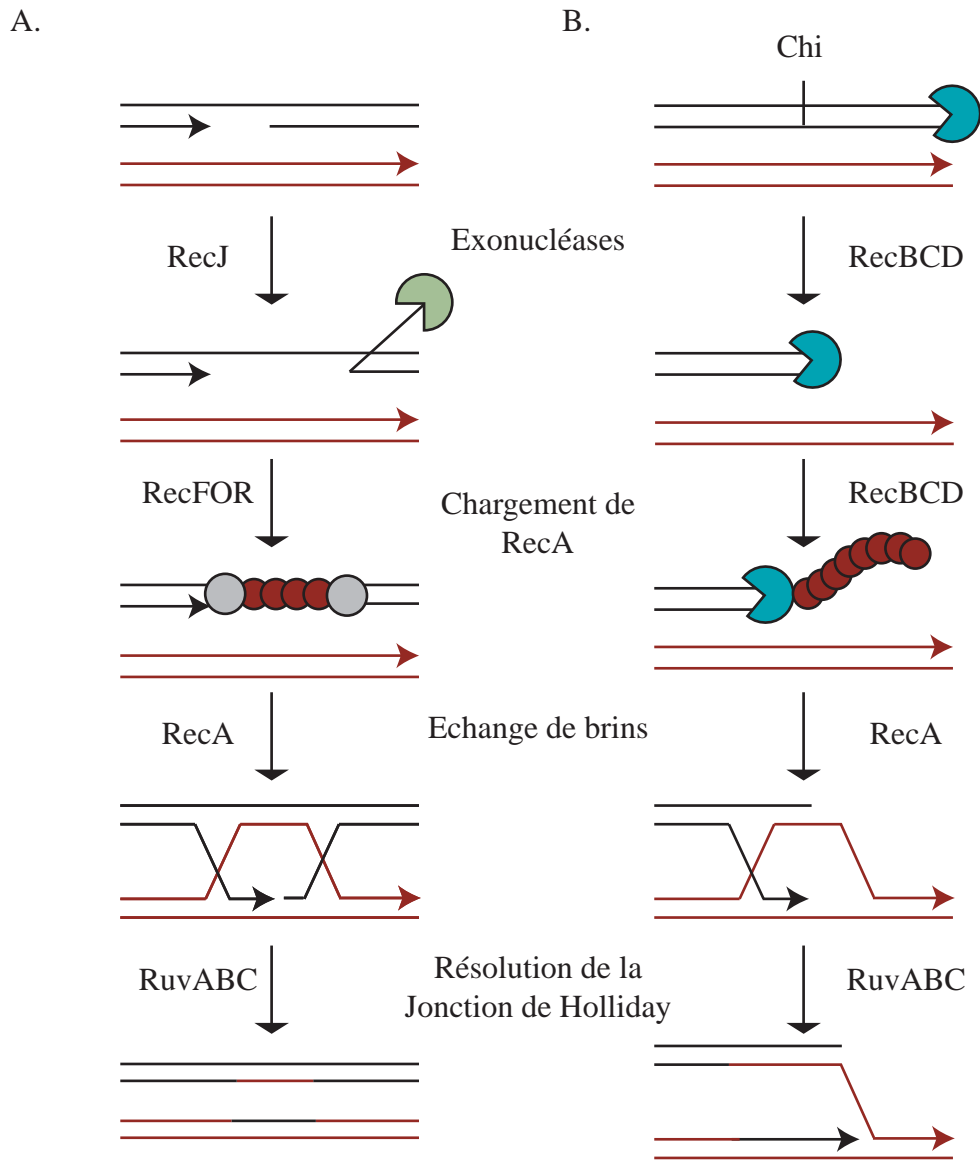


Figure 20. Réparation par recombinaison homologue.

A. Réparation d'une cassure simple brin. La cassure est « agrandie » par l'activité exonucléase 5'-3' de RecJ. L'ADN simple brin est protégé par SSB (non montré) et le complexe RecFOR permet le chargement de RecA, ce qui entraîne l'échange de brins. La jonction de Holliday ainsi formée est alors résolue par le complexe RuvABC.

B. Réparation d'une cassure double brin. Le complexe RecBCD se charge sur l'ADN double brin, au niveau de la cassure, et le dégrade jusqu'à ce qu'il rencontre un site Chi. Après avoir rencontré un site Chi, l'activité de RecBCD est modifiée, et RecA se charge sur l'extrémité 3' de l'ADN simple brin. Il se produit alors un échange de brins qui conduit à la formation d'une jonction de Holliday. La jonction est ensuite résolue par RuvABC. Adjacente à la jonction de Holliday, la boucle formée, « D-loop », va permettre l'assemblage d'un replisome, assurant ainsi la reprise de la réplication. Les traits noirs et rouges représentent les brins d'ADN de deux molécules homologues. Les flèches indiquent l'extrémité 3' des brins d'ADN. Les cercles rouges représentent RecA, les cercles gris RecFOR, et les $\frac{3}{4}$ de cercle RecJ (en vert) et RecBCD (en bleu). D'après Michel *et al.*, 2007.

machinerie de réplication. Ainsi, une topoisomérase active ne pourrait être formée que lorsque le réplisome est dissocié, c'est-à-dire lorsque la réplication est terminée (Espeli *et al.*, 2003b). D'autre part, différentes études ont relié la protéine FtsK ainsi que le système de recombinaison XerCD-*dif* à la décaténation des chromosomes frères. Les implications de FtsK et de XerCD-*dif* dans cette étape tardive de la ségrégation des chromosomes fait l'objet du paragraphe III.3.6.

3.1.2 Les dimères de chromosome

Les cellules sont soumises à de nombreux stress qui endommagent l'ADN. Une réplication complète du chromosome nécessite donc l'action des mécanismes de réparation de l'ADN. Deux voies majeures de réparation par recombinaison homologue existent chez *E. coli*. La première est dédiée à la réparation des cassures double brin, c'est la voie RecBCD, alors que la deuxième prend en charge les cassures simple brin, la voie RecFOR (pour revues Dillingham et Kowalczykowski, 2008 ; Michel *et al.*, 2007) (Figure 20). Bien que lors des premières étapes de la réparation ces deux voies impliquent des protéines différentes, elles mettent en jeu, toute les deux, la protéine RecA. RecA est l'acteur principal de la recombinaison homologue. Elle se lie à l'ADN simple brin pour former un filament ADN-protéine. Le filament RecA envahi l'ADN double brin de la molécule homologue et s'apparie avec le brin complémentaire. Cet échange de brin entre les chromosomes frères entraîne la formation d'une jonction de Holliday. La jonction de Holliday va par la suite être résolue par l'endonucléase RuvC après migration de branche catalysée par le complexe RuvAB ou l'hélicase RecG. RuvC peut catalyser la réaction de coupure de la jonction de Holliday dans les deux orientations (Figure 21) conduisant ou pas à un échange entre les deux chromatides sœurs, également appelé crossing-over. Un nombre impair de crossing-over lie les deux chromosomes frères en une molécule unique appelée dimère de chromosome (Figure 21). La formation des dimères de chromosome dépend ainsi de la fréquence de recombinaison entre chromosomes frères et de la fréquence à laquelle ces évènements conduisent à un crossing-over. Chez *E. coli*, il est estimé que les dimères de chromosome sont formés dans 15% des cellules à chaque génération dans des conditions standards de croissance (Steiner et Kuempel, 1998b) ; Pérals *et al.*, 2000). Leur résolution en monomères, effectuée par le système de recombinaison Xer, est sous la dépendance de la protéine FtsK (pour revue Lesterlin *et al.*, 2004).

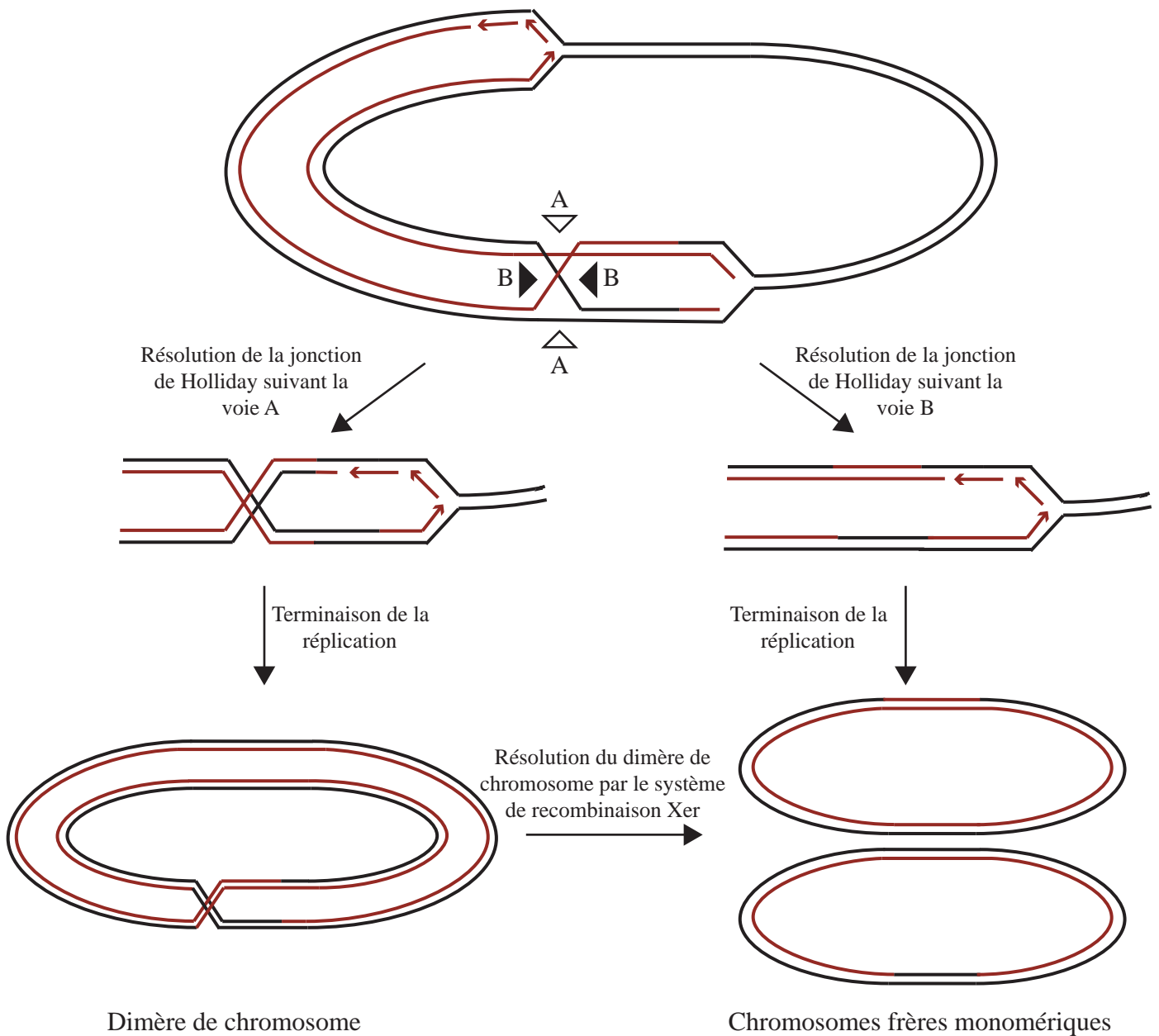


Figure 21. Formation et résolution d'un dimère de chromosome.

Lors de la réplication du chromosome, les événements de recombinaison homologue peuvent conduire à un échange entre chromatides sœurs. Cela dépend du sens de résolution de la jonction de Holliday par RuvC, voie A ou voie B. A la fin de la réplication, un nombre impair d'échanges entre chromatides sœurs lie les chromosomes frères en une seule molécule, un dimère. Les dimères de chromosome sont résolus en monomères par le système de recombinaison spécifique de site Xer. Les brins d'ADN sont représentés par des traits noirs (ADN parental) et rouge (ADN issu de la réplication). Les deux sens de résolution de la jonction de Holliday par RuvC, voie A et voie B, sont indiqués par des triangles blancs et noirs, respectivement. La réplication des brins continu et discontinu est indiquée par une et deux flèches, respectivement (d'après Cox *et al.*, 2000).

3.2 FtsK couple division et ségrégation

FtsK est une protéine multifonctionnelle de 1329 acides aminés (pour revue Bigot *et al.*, 2007). Elle appartient à la famille des translocases à ADN double brin FtsK/SpoIIIE/Tra. Les translocases sont des protéines capables de se déplacer sur les molécules d'acides nucléiques grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse de molécules d'ATP (pour revue Singleton *et al.*, 2007). Lorsqu'elles sont « fixées » à la membrane, comme c'est le cas pour les membres de la famille FtsK/SpoIIIE/Tra, elles jouent le rôle de « pompes » en tirant sur les molécules d'acide nucléique. La protéine SpoIIIE est impliquée dans le transfert du chromosome de la cellule mère à la préspore lors de la sporulation chez *Bacillus subtilis* (pour revue Errington, 2003). Les protéines Tra, comme la protéine TraSA du plasmide pSAM2 de *Streptomyces* (Possoz *et al.*, 2001), sont codées par des éléments conjugatifs. Elles sont impliquées dans le transfert de l'élément excisé vers une cellule receveuse.

La translocase FtsK est constituée de trois domaines. Le domaine N-terminal porte quatre segments transmembranaires (Dorazi et Dewar, 2000) qui la localise au centre de la cellule en division, le septum de division, et l'implique dans un complexe multiprotéiques essentiel à la division cellulaire, le divisome (pour revues Goehring et Beckwith, 2005 ; Vicente *et al.*, 2006). Le domaine C-terminal, qui porte le moteur de la translocation, est nécessaire aux étapes tardives de la ségrégation des chromosomes. Il assure que de l'ADN ne puisse pas être piégé lors de la fermeture du septum de division en stimulant la décaténation par la Topoisomérase IV (Paragraphe III.3.6) et en activant le système Xer de résolution des dimères de chromosome (Paragraphe III.3.7). Il est également proposé que la translocation par FtsK contrôle les étapes tardives de la synthèse du septum de division (Lesterlin *et al.*, 2008), possiblement via son interaction avec FtsI (PBP3) qui est impliquée dans la synthèse du peptidoglycane au septum de division (Grenga *et al.*, 2008).

Les domaines N- et C- terminaux sont reliés par un long domaine de 600 acides aminés, riche en résidus proline et glutamine. Il a été mis en évidence que ce domaine « linker » n'est pas essentiel, mais requis pour une division cellulaire correcte (Bigot *et al.*, 2004). Ceci, associé à des expériences de double-hybride, suggère que le « linker » pourrait participer à la multimérisation de FtsK et aux interactions avec les autres protéines du divisome (Bigot *et al.*, 2004 ; Grenga *et al.*, 2008). D'autre part, il a été démontré récemment l'implication de ce domaine dans l'efficacité de résolution des dimères de chromosome. Les auteurs ont mis en évidence qu'il n'y a pas de région spécifique du « linker » impliquée, mais

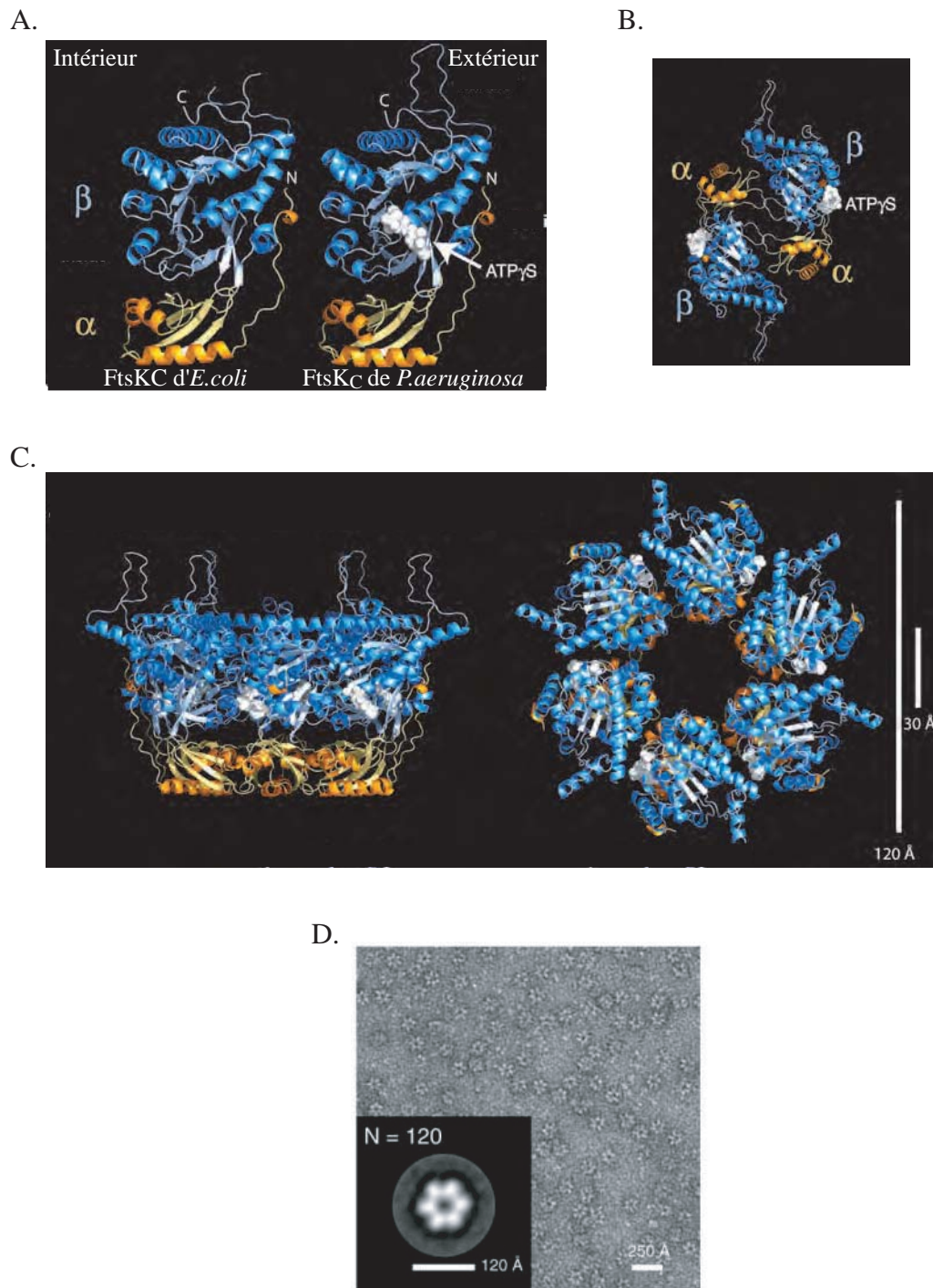


Figure 22. La protéine FtsK s'organise en hexamères autour de l'ADN.

A. Structures des domaines C-terminaux de FtsK d'*E. coli* (à gauche) et de *P. aeruginosa* (à droite). Le sous domaine γ est invisible et les sous domaines α (en jaune) et β (en bleu) sont reliés par deux feuillets β , ce qui les espace légèrement. L'orientation des monomères est indiquée par rapport à la structure hexamérique (C), avec à gauche l'intérieur de l'anneau et à droite l'extérieur. **B.** Structure d'un dimère de FtsKC, retrouvé dans plusieurs cristaux obtenus avec les protéines d'*E. coli* et de *P. aeruginosa*. Le dimère est constitué de deux monomères positionnés tête bêche. **C.** Structure de l'hexamère de FtsKC $\Delta\gamma$ de *P. aeruginosa* montrée de côté (à gauche) et de dessus (à droite). Les six sous-unités forment un anneau dont le diamètre extérieur est de 120 Å et le canal intérieur de 30 Å. Les sites de fixation des nucléotides, contenant dans la structure des molécules d'ADP, sont proches de l'extérieur de l'anneau et proches de la sous-unité adjacente, sans être à l'interface de deux monomères. **D.** FtsKC $\Delta\gamma$ de *P. aeruginosa* forme des anneaux hexamériques autour de l'ADN. Image de microscopie électronique montrant des hexamères de FtsKC $\Delta\gamma$ formés autour d'un ADN de 30pb (Massey *et al.*, 2006).

que la longueur du domaine est importante pour assurer correctement la résolution des dimères de chromosome (Dubarry et Barre, 2010).

3.3 Structures et fonctions du domaine carboxy-terminal de FtsK

Le domaine C-terminal peut se diviser en trois sous-domaines, α , β , et γ (Yates *et al.*, 2003). Les sous-domaines α et β correspondent au moteur de la translocation et portent les signatures caractéristiques des ATPase qui sont les motifs de type Walker A et Walker B (Walker *et al.*, 1982) impliqués respectivement dans la fixation et l'hydrolyse des nucléotides (Bell, 2005). Du à des problèmes de toxicité et d'insolubilité, la structure du domaine C-terminal de FtsK a été résolue seulement pour un mutant (K997A dans le motif Walker A) déficient en activité ATPase (Massey *et al.*, 2006). La structure obtenue par diffraction aux rayons X montre la protéine sous forme dimérique où deux monomères sont positionnés tête-bêche (Figure 22B). Le monomère comprend les sous-domaines α et β reliés par deux feuillets β , ce qui espace légèrement les deux sous-domaines (Figure 22A). Cependant, le sous-domaine γ étant désordonné, il n'est pas visible sur la structure (Figure 22). Les mêmes auteurs ont également résolu la structure du domaine C-terminal de FtsK de *Pseudomonas aeruginosa*, qui est très similaire à celle de la protéine FtsK d'*E. coli* (Massey *et al.*, 2006). Néanmoins, elle montre la manière dont le sous-domaine β lie une molécule d'ATP (les cristaux ont été obtenus avec une molécule d'ATP faiblement hydrolysable, ATP γ S) (Figure 22A). Ces différentes données ont ainsi permis de mettre en évidence que le sous-domaine β est structuré de la même manière que les ATPase oligomériques de type RecA (pour revue Ye *et al.*, 2004). D'autre part, la structure du domaine C-terminal de FtsK de *P. aeruginosa* dépourvue du domaine γ , FtsKC $\Delta\gamma$, ainsi que des images de microscopie électronique obtenue en présence d'ADN montrent que les sous-domaines α et β multimérisent pour former un anneau hexamérique entourant la molécule d'ADN double brin (Figure 22) (Massey *et al.*, 2006).

Bien que le mécanisme de translocation de FtsK soit encore mal connu, il a été mis en évidence *in vitro* que c'est une des translocases les plus rapide puisqu'elle possède une vitesse maximale de translocation de 6,7kpb s⁻¹ (Saleh *et al.*, 2004). Il a également été montré que la translocation nécessite une faible rotation de l'hexamère par rapport à l'ADN (Saleh *et al.*, 2005) et un modèle de translocation dans lequel chacune des six sous-unités hydrolyse une molécule d'ATP de manière séquentielle a été proposé (Massey *et al.*, 2006). Ce modèle est

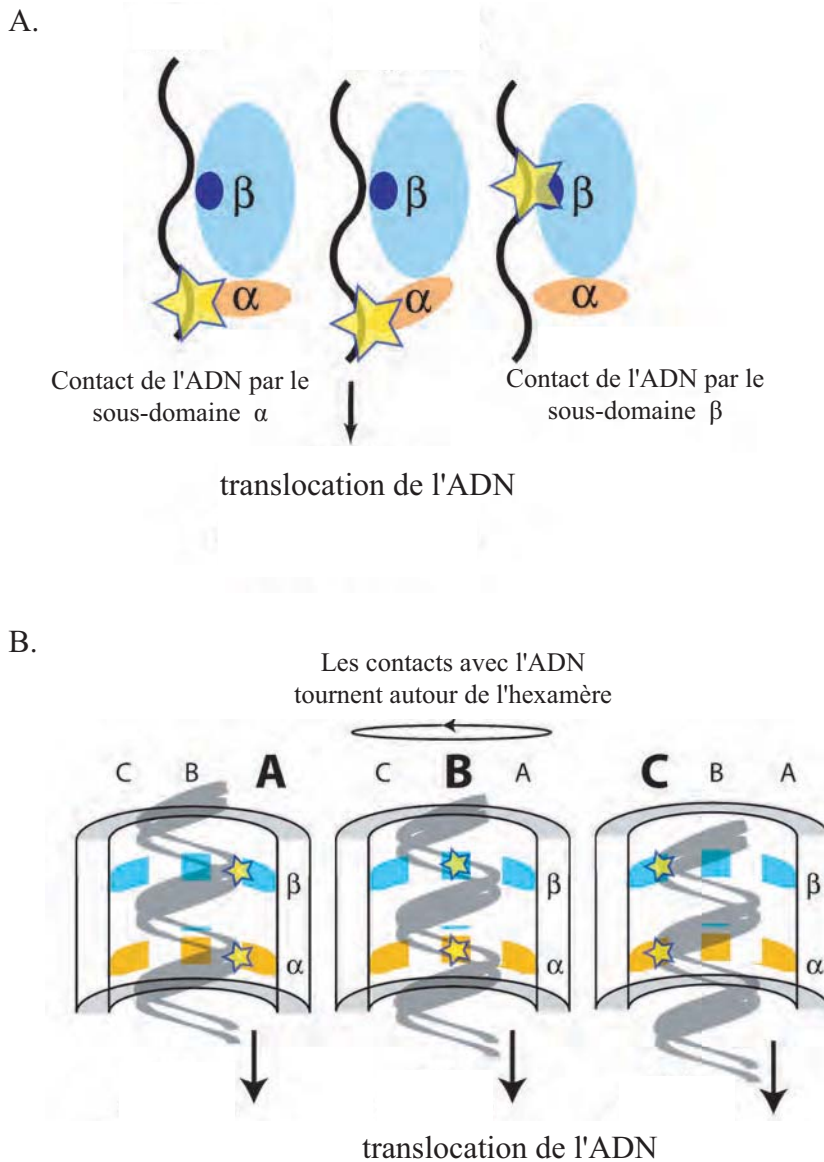


Figure 23. Modèle de translocation de l'ADN par la protéine FtsK.

A. Modèle de translocation proposé pour une seule sous-unité. Le sous-domaine α (en orange) contacte l'ADN, ce qui est représenté par une étoile, puis la fixation d'ATP, l'hydrolyse et la libération d'ADP entraîne un changement conformationnel qui permet la translocation de l'ADN de 1,6pb. Après ce mouvement, l'ADN n'est plus lié par la sous-unité α mais par la sous-unité β . La direction de translocation indiquée est arbitraire. **B.** Modèle de translocation par l'hexamère. Une fois effectué son cycle catalytique, la sous-unité A n'est plus en contact avec l'ADN. La nature hélicoïdale de l'ADN permet alors la liaison du sous-domaine α de la sous-unité B et un autre cycle de translocation est effectué. Les six sous-unités vont ainsi de manière séquentielle effectuer un cycle catalytique. Ce modèle implique peu ou pas de rotation de l'ADN par rapport à l'hexamère (Massey *et al.*, 2006).

basé sur la comparaison des structures du domaine C-terminal de FtsK de *P. aeruginosa* obtenues en présence d'ATP γ S (monomères tête-bêche) et d'ADP (hexamères) qui montrent un changement conformationnel au niveau des deux sous-domaines, et est représenté figure 23. Dans un premier temps, le contact avec l'ADN se fait via le sous-domaine α . Puis, la fixation, l'hydrolyse d'ATP et la libération d'ADP, entraînent un changement conformationnel qui éloigne les deux sous-unités et mènent à la translocation de l'ADN de 1,6pb. Enfin, l'ADN se retrouve en contact seulement avec le sous-domaine β , le sous-domaine α ne pouvant plus interagir avec l'ADN. A la fin de ce cycle, le sous-domaine α du monomère attendant est correctement positionné pour lier l'ADN, et un autre cycle de translocation est effectué (Figure 23B). Dans ce modèle, chaque sous-unité hydrolyse une molécule d'ATP de manière séquentielle autour de l'hexamère. Cependant, il a récemment été mis en évidence que la vitesse de translocation est inchangée lorsque deux sous-unités de l'hexamère sont déficientes en activité ATPase (Croizat *et al.*, 2010). Ce résultat n'étant pas en accord avec le modèle proposé précédemment, les auteurs en proposent un autre, appelé « *sequential escort model* ». L'hydrolyse se ferait toujours de manière séquentielle, mais les six sous-unités seraient dans un état catalytique différent (ATP, transition ATP/ADP, ADP, ou libre), et l'ADN serait toujours contacté par 3 sous-unités. Ce modèle, basé sur celui proposé pour Rho (Thomsen et Berger, 2009), reste toutefois à vérifier d'un point de vue structural pour FtsK.

Par ailleurs, il n'a pas encore été établi si la translocation se fait par la reconnaissance d'un seul brin du duplex ou si FtsK est capable de reconnaître les deux brins d'ADN. Récemment, il a été mis en évidence une asymétrie dans la préférence de contacts entre les deux brins d'ADN (Bonné *et al.*, 2009). De plus, les mêmes auteurs ont mis en évidence que FtsK avait une fonction d'hélicase à ADN puisqu'elle est capable de transloquer de l'ADN simple brin, dans les deux sens, sur au moins 5 nt. Bien qu'il n'y ait aucune preuve évidente, ces résultats iraient dans le sens que FtsK, comme c'est le cas pour la majorité des translocases et hélicases à ADN double brin (Singleton *et al.*, 2007), n'utiliserait qu'un seul brin de la double hélice pour se déplacer.

Les 81 acides aminés à l'extrême C-terminal de la protéine FtsK forment le sous-domaine γ . Il est relié au moteur par un court « *linker* » flexible composé de résidus glycine, ce qui pourrait expliquer qu'il ne soit pas visible dans les structures des domaines C-terminaux de FtsK (Massey *et al.*, 2006). Néanmoins, pour les sous-domaines γ d'*E.coli* et de *P. aeruginosa* isolés, des structures ont pu être résolues par RMN (Résonance Magnétique

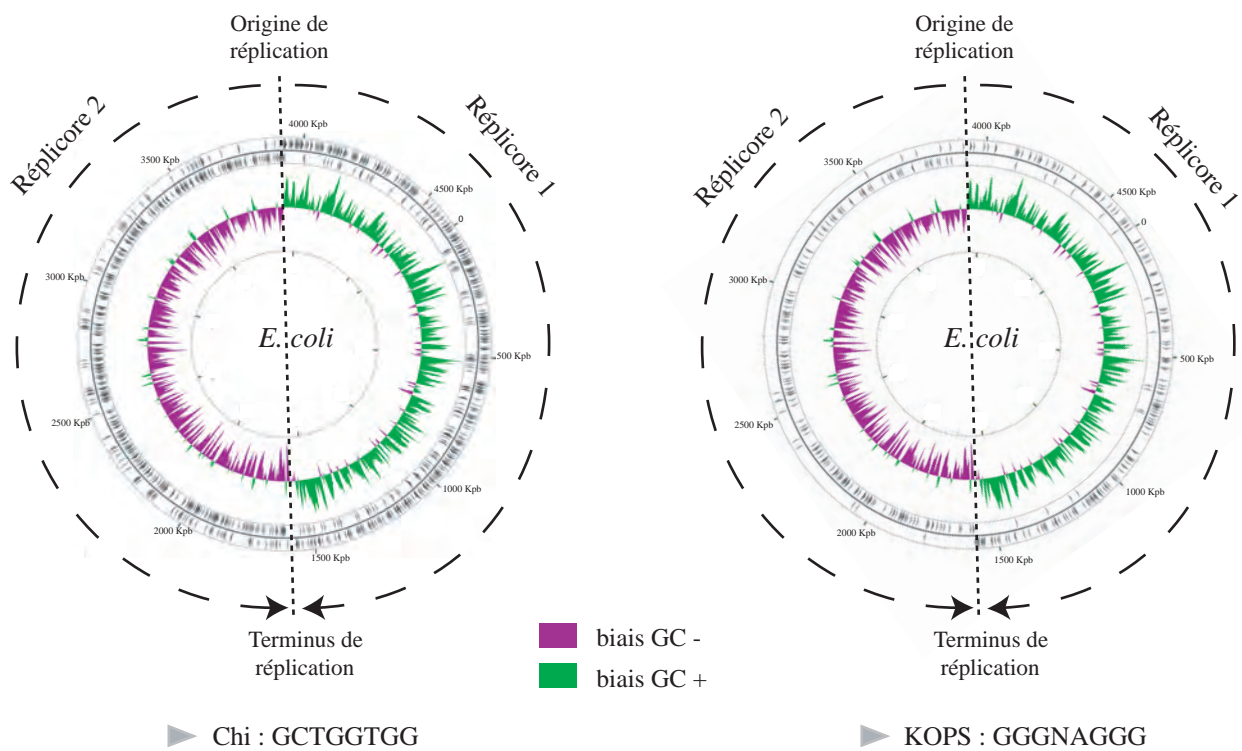


Figure 24. Organisation du chromosome d'*E. coli*.

Le chromosome d'*E. coli* est composé de deux répliores (représentés par des flèches en pointillés), délimités par l'origine de répliation d'un côté et le terminus de répliation de l'autre. Suivant l'axe origine/terminus de répliation (trait discontinu), le génome est constitué de nombreux biais. Sur les schémas sont représentés le biais de composition en bases G/C (en violet lorsqu'il est positif et en vert lorsqu'il est négatif), et les deux oligomères polarisés de fonction connue (triangles gris), le site Chi (à gauche) et les motifs KOPS (à droite)

Nucléaire) (Sivanathan *et al.*, 2006) et en présence d'ADN un co-cristal avec le sous-domaine γ d'*E. coli* a été obtenu (Löwe *et al.*, 2008) (paragraphe III.3.4.2). Chez *E. coli*, FtsK γ joue deux rôles majeurs puisque, comme nous allons le voir, il est impliqué dans l'orientation de la translocation, par la reconnaissance de motifs biaisés sur le chromosome, et dans l'activation du système Xer, en interagissant directement avec la recombinase XerD.

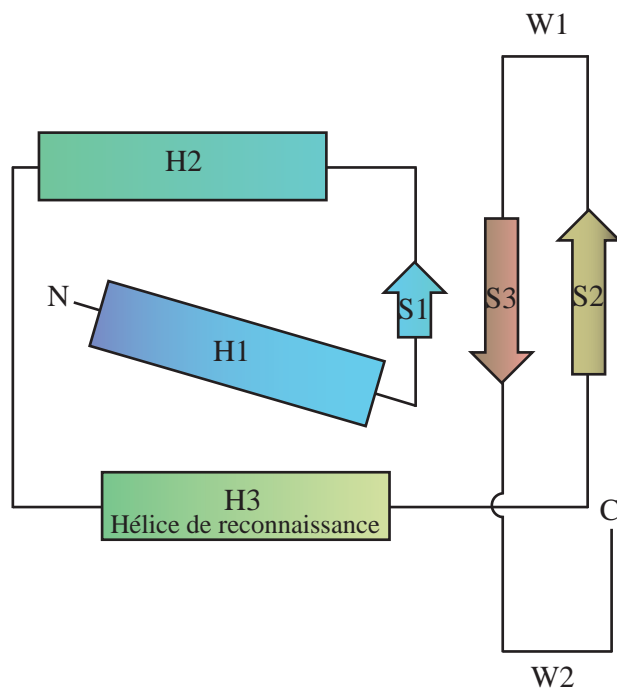
3.4 FtsK est orientée par les KOPS

3.4.1 Les KOPS, des motifs biaisés sur le chromosome

Un niveau important d'organisation des chromosomes bactériens est la composition de la séquence nucléotidique. En effet, les génomes sont constitués par de nombreux biais, notamment la composition en bases, la distribution d'oligomères ou l'orientation de gènes. Ces divers biais coïncident avec le mode de réplication bidirectionnel qui scinde le chromosome en deux bras, délimités par le site *oriC* d'un côté et le terminus de réplication de l'autre. Le séquençage du génome complet d'*E. coli* K12 a révélé cette composition chromosomique et a permis aux auteurs de proposer le terme de réplimore pour regrouper ces deux niveaux d'organisation (Blattner *et al.*, 1997). Ainsi, le génome d'*E. coli* est organisé en deux réplimores, I et II, délimités de part et d'autre par les sites *oriC* et *dif* (Figure 24). Cette organisation particulière du génome, permet notamment l'utilisation du biais de composition en bases G et C ((G-C)/(G+C)) ou des biais d'oligomères, comme outils afin de localiser les régions origine et terminus de réplication putatifs des chromosomes séquencés (Salzberg *et al.*, 1998 ; Picardeau *et al.*, 1999 ; Hendrickson et Lawrence, 2007) (Figure 24). Le chromosome d'*E. coli* est composé de nombreux oligomères biaisés suivant l'axe *oriC/dif*, c'est-à-dire qu'ils sont surreprésentés et leur orientation est inversée entre les réplimores I et II (Salzberg *et al.*, 1998 ; Lobry et Louarn, 2003). Les oligomères fortement polarisés sont nombreux et pour la très grande majorité de fonction inconnue puisque seulement deux octamères ont fait l'objet d'études fonctionnelles, les sites Chi (5'GCTGGTGG3') (Smith *et al.*, 1981 ; Bianco et Kowalczykowski, 1997) et les sites KOPS (5'GGGNAGGG3') (Bigot *et al.*, 2005 ; Levy *et al.*, 2005) (Figure 24).

Les sites Chi (Cross-over Hot-spot Instigator) sont impliqués dans la voie de recombinaison homologue RecBCD, comme nous l'avons vu précédemment (pour revue Dillingham et Kowalczykowski, 2008). RecBCD est un complexe hélicase-nucléase qui lorsqu'il rencontre un site Chi dans la bonne orientation change la polarité de son activité

A.



B.

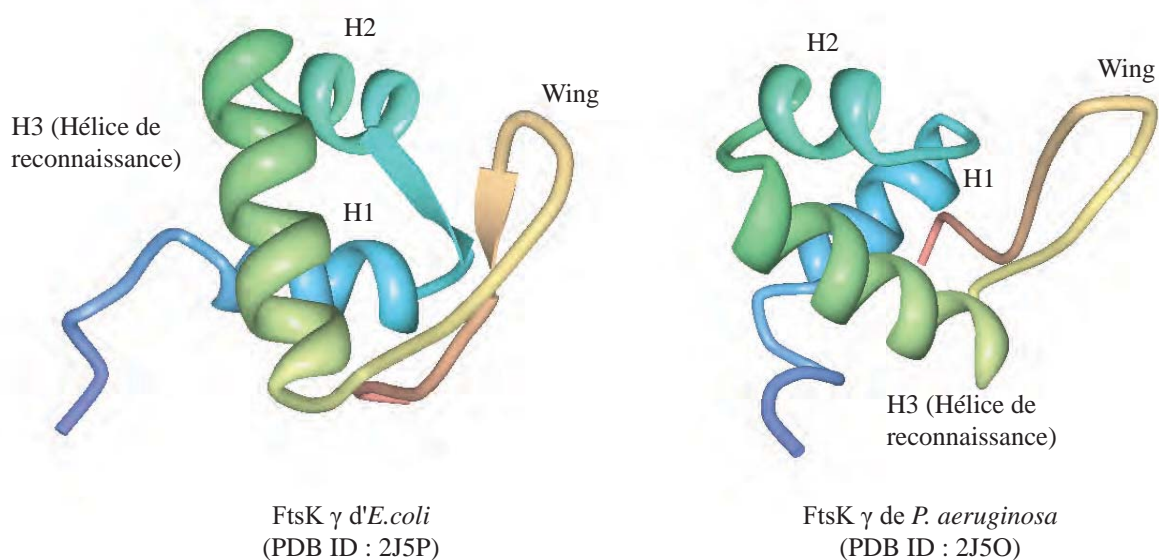


Figure 25. Structure du sous-domaine γ de FtsK.

A. Topologie d'un domaine « winged helix ». Il est constitué de 2 grandes boucles ou « ailes » (W1 et W2), de 3 hélices (H1, H2, et H3), et de 3 feuilletts (S1, S2, S3). L'hélice 3 est également appelée hélice de reconnaissance car les contacts de la protéine avec l'ADN sont principalement réalisés par cette hélice (d'après Gajiwala et Burley, 2000). **B.** Structure des sous-domaines γ de FtsK d'*E. coli* (à gauche) et de *P. aeruginosa* (à droite). Le code couleur utilisé est le même qu'en A. Les codes PDB sont indiqués.

exonucléase (de 3' en 5') et facilite le chargement de la protéine RecA sur l'extrémité 3' simple brin qu'il vient de libérer. La protéine RecA forme alors un filament nucléoprotéique capable d'envahir l'ADN double brin homologue, permettant ainsi la réparation d'une cassure double brin et le redémarrage de la réplication (Figure 20).

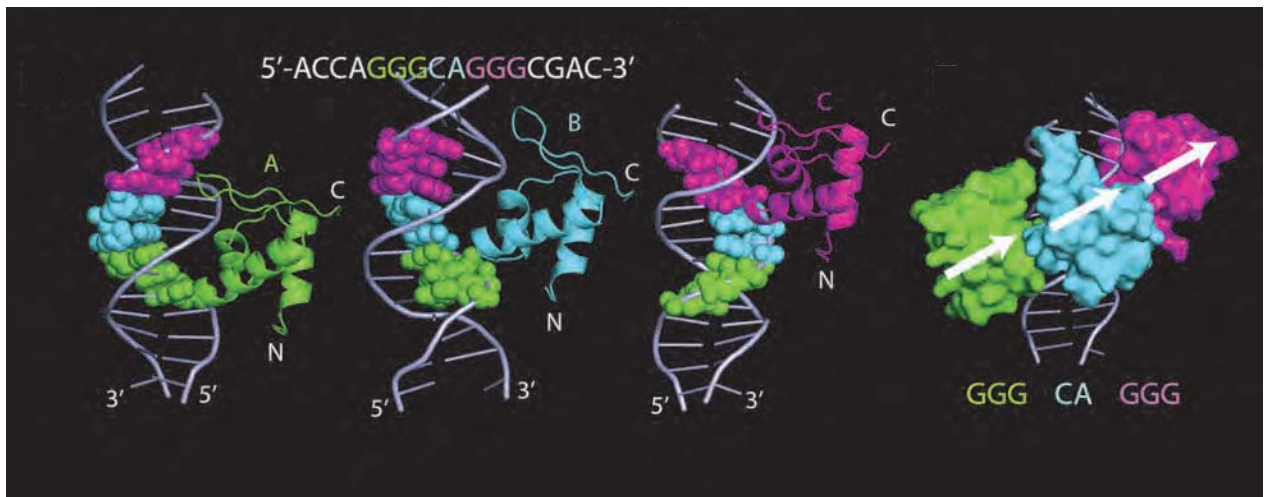
Les sites KOPS (*FtsK Orienting Polarized Sequence*) sont des motifs reconnus par la protéine FtsK, orientant sa translocation (Bigot *et al.*, 2005 ; Levy *et al.*, 2005). Leur orientation s'inversant à *dif*, ils dirigent toujours la translocase vers le site de résolution des dimères de chromosome. De ce fait, il est nécessaire que le site *dif* soit positionné à la jonction des réplicores (Cornet *et al.*, 1996 ; Pérals *et al.*, 2000 ; Corre *et al.*, 2000 ; Capiaux *et al.*, 2001 ; Lesterlin *et al.*, 2005). L'activité des KOPS a été mise en évidence *in vitro* par leur faculté d'inhiber la recombinaison Xer lorsqu'ils sont placés en orientation non permissive 5'CCCTNCCC3' (Bigot *et al.*, 2005 ; Levy *et al.*, 2005). Par la suite, il a été montré que ces motifs sont reconnus par le sous-domaine γ de la protéine FtsK (Sivanathan *et al.*, 2006 ; Sivanathan *et al.*, 2009 ; Löwe *et al.*, 2008).

3.4.2 Mode de reconnaissance des KOPS par FtsK

Les structures des sous-domaines γ d'*E.coli* et de *P. aeruginosa*, résolues par RMN, ont permis de mettre en évidence que le sous-domaine γ contient un domaine de liaison à l'ADN de type « winged-helix » (Sivanathan *et al.*, 2006). Les protéines winged-helix constituent un sous ensemble de la grande famille que forment les protéines helix-turn-helix. Généralement, le motif winged helix est constitué de 2 grandes boucles ou « ailes » (W1 et W2), de 3 hélices (H1, H2, et H3), et de 3 feuillets (S1, S2, S3) (Figure 25A). Dans la majorité des cas, les principales interactions entre l'ADN et la protéine se font par un contact de l'hélice 3 (H3), qui est également appelée hélice de reconnaissance, au niveau du sillon majeur de l'ADN, et par un contact de « l'aile » W2 positionnée à l'extrême C-terminal de la protéine avec le sillon mineur de l'ADN (Gajiwala et Burley, 2000).

La structure du sous-domaine γ de FtsK d'*E. coli* montre qu'il est constitué des 3 hélices (H1, H2, H3), de deux feuillets (S1 et S3) ainsi que d'une « aile » C-terminale (W) (Figure 25B). Le co-cristal du sous-domaine γ de FtsK de *P. aeruginosa* avec un segment d'ADN de 16pb contenant le motif KOPS GGGCAGGG, a permis de confirmer que γ est un domaine winged helix, qui contacte l'ADN au niveau du sillon majeur principalement avec l'hélice 3 (H3) et au niveau du sillon mineur avec son « aile » (Löwe *et al.*, 2008). Cette

A.



B.

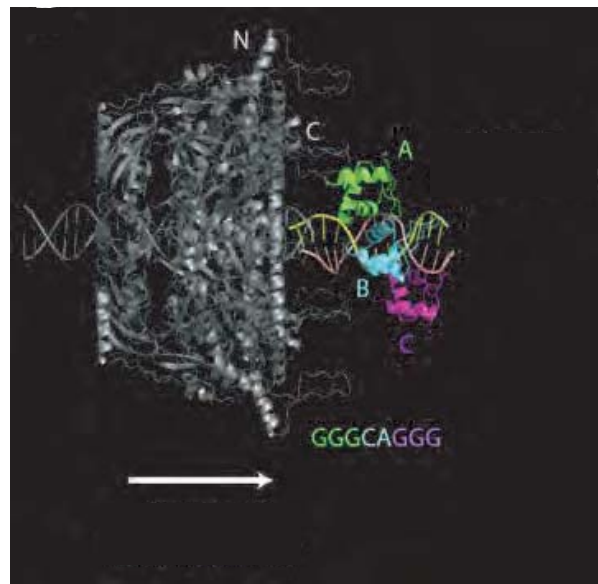


Figure 26. Structure du cocristal de FtsKy de *P. aeruginosa* avec un ADN contenant un KOPS.

A. Trois sous-domaine γ reconnaissent un motif KOPS. Les sous-unités A et C, en vert et violet respectivement, reconnaissent le triplet de bases CCC. La sous-unité B, en bleu, s'insère entre les deux autres, et bien qu'elle fasse peu de contact avec l'ADN, reconnaît le dinucléotide central CA. Le mode de fixation des sous-unité A et C est similaire, avec une interaction par l'aile du sillon majeur de l'ADN. La reconnaissance par un même domaine de différentes parties d'un ADN est possible puisque les sous-unités interagissent entre elles. L'orientation des trois sous-domaines γ sur l'ADN est la même, ce qui est schématisé par des flèches sur la figure de droite. **B.** Modèle structural du domaine C-terminal entier de FtsK sur l'ADN. Ce modèle a été créé en plaçant les parties N-terminales des sous-domaines γ adjacentes à la partie C-terminale du moteur α - β . Un linker de 14 acides aminés, qui est absent des structures, relie le moteur aux sous-domaines γ . La flèche indique la direction du mouvement de FtsK. Les auteurs proposent ainsi que les sous-domaines γ sont en avant du sens de translocation et que l'ADN traverse l'hexamère en passant tout d'abord par les sous-domaines β (Löwe *et al.*, 2008).

structure a également permis de mettre en évidence qu'un motif KOPS est reconnu par trois sous-domaines γ , ce qui avait été proposé préalablement par des expériences de gel filtration (Sivanathan *et al.*, 2006). En effet, comme le montre la figure 26A, les sous-unités A et C reconnaissent les deux répétitions de bases GGG et la sous-unité B le dinucléotide central CA. De plus, des expériences de mutagenèse dirigée sur l'hélice 3 et l'aile, suivies par différents tests d'activité, ont permis de mettre en évidence les résidus importants dans la reconnaissance des KOPS (Sivanathan *et al.*, 2006). Plus particulièrement, le triple mutant de FtsK, R1300A, E1303A, E1306A, (également appelé « KOPS *blind* ») apparaît être un bon outil d'étude puisqu'il ne reconnaît plus les motifs KOPS alors qu'il conserve toutes les autres activités (Sivanathan *et al.*, 2009).

D'autre part, le co-cristal montre que l'orientation des trois domaines sur l'ADN est la même, avec leur partie N-terminale en direction de l'extrémité 5' de la séquence KOPS (Löwe *et al.*, 2008). Ceci a permis aux auteurs de proposer un modèle de structure du domaine C-terminal entier de FtsK sur l'ADN (Figure 26B). Sur ce modèle, le moteur hexamérique est placé en arrière et les domaines γ en avant du sens de translocation, en accord avec le modèle proposé au préalable par Bigot et ses collaborateurs (Bigot *et al.*, 2006).

3.4.3 Mode d'action des KOPS sur l'orientation de la translocation

Les expériences sur la direction de translocation de FtsK ont été réalisées principalement *in vitro* avec une forme tronquée de la protéine au niveau des domaines transmembranaires et d'une grande partie du linker, appelée FtsK_{50C} (Aussel *et al.*, 2002). L'activité de translocation peut être observée de manière directe par des expériences de molécule unique utilisant des pinces optiques ou magnétiques et de manière indirecte en mesurant l'inhibition de la recombinaison à *dif* par des motifs placés en orientation non permissive, cette dernière expérience étant également utilisé *in vivo*. Les premiers résultats obtenus suggèrent que la protéine s'arrête de transloquer lorsqu'elle rencontre des KOPS placés en orientation non permissive, et parfois qu'elle change de sens de translocation (Bigot *et al.*, 2005 ; Pease *et al.*, 2005 ; Ptacin *et al.*, 2006 ; Saleh *et al.*, 2004 ; Levy *et al.*, 2005). De plus, l'effet des KOPS est cumulatif puisqu'un seul motif a très peu d'effet alors que trois motifs placés en orientation non permissive ont un effet important sur la translocation (Bigot *et al.*, 2005). Deux hypothèses se posent alors quant à l'effet des KOPS sur la translocation par FtsK. La première propose que les KOPS soient des sites préférentiels de chargement de FtsK et de cette manière orientent la translocation. Dans la seconde, les KOPS sont reconnus

par la protéine déjà chargée sur l'ADN et transloquant. FtsK ne reconnaîtrait dans ce cas, que les motifs placés en orientation non permissive, ce qui la stopperait, la dégagerait de l'ADN et/ou entraînerait un changement de direction. Les premiers résultats, associé au fait que FtsK est capable de se charger et de transloquer n'importe quel ADN possédant ou non des motifs KOPS (Aussel *et al.*, 2002 ; Levy *et al.*, 2005 ; Massey *et al.*, 2004 ; Pease *et al.*, 2005 ; Saleh *et al.*, 2004 ; Saleh *et al.*, 2005), allaient dans le sens de la deuxième hypothèse. Par la suite, il a été mis en évidence la nécessité de plus de 10pb en amont des KOPS pour un chargement optimal de la protéine FtsK sur l'ADN. Ceci, associé à des expériences de molécule unique où des motifs KOPS ont été placés à différentes distances sur la molécule d'ADN, indiquent que les KOPS sont des sites de chargement préférentiels orientant la translocase sur l'ADN (Bigot *et al.*, 2006). Ce modèle est plus en accord avec le rôle biologique de la protéine puisqu'il assure que la protéine se charge dans la bonne direction, évitant ainsi la perte d'énergie due à des moteurs mal orientés. De cette manière la translocation paraît plus efficace en permettant une coordination de l'activité de plusieurs moteurs hexamériques. Ce modèle a, par la suite, été appuyé par des expériences de recombinaison où un motif en orientation non permissive est placé entre le site de recombinaison et un KOPS en orientation permissive (Löwe *et al.*, 2008). La recombinaison commence à être inhibée à partir d'une distance de 10pb entre le site *dif* et le premier motif KOPS, c'est-à-dire la distance minimale nécessaire au chargement de la protéine sur le KOPS non permissif (Bigot *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent donc que les KOPS en orientation non permissive ne sont pas reconnus par FtsK lorsqu'elle transloque l'ADN et vont dans le sens d'un chargement préférentiel de FtsK sur ces motifs (Löwe *et al.*, 2008). Ainsi, les arrêts de translocation ou les changements de direction sont proposés comme étant la résultante de collisions entre différents moteurs hexamériques transloquant dans des directions opposées (Löwe *et al.*, 2008). En accord avec ce modèle, des moteurs hexamériques (FtsK $\Delta\gamma$) se faisant face avaient déjà été visualisés en microscopie électronique (Massey *et al.*, 2006).

3.5 Un contrôle de FtsK dans le temps et l'espace

Il a été mis en évidence que la résolution des dimères de chromosome n'a pas lieu juste à la fin de la réplication du chromosome mais après un certain délai (Steiner et Kuempel, 1998a). Les résultats obtenus en regardant à la fois la localisation de FtsK au septum (fusionnée à la YFP) et la recombinaison à *dif* par PCR quantitative indiquent fortement que la recombinaison a lieu juste avant ou de manière concomitante avec la fermeture du septum

de division (Kennedy *et al.*, 2008). Ces données sont en accord avec le fait que la division cellulaire est nécessaire pour la résolution des dimères de chromosome (Steiner et Kuempel, 1998a) ; Kennedy *et al.*, 2008). En effet, dans des souches mutées pour les gènes codant FtsI ou FtsQ, impliquées dans les étapes tardives de l'assemblage du divisome, il n'y a pas de recombinaison bien que FtsK soit toujours localisée au septum (Steiner et Kuempel, 1998a) ; Kennedy *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'ajout de cephalexine, qui est un inhibiteur de l'activité transpeptidase de FtsI, inhibe la recombinaison Xer mais pas la localisation de FtsK (Kennedy *et al.*, 2008). Ainsi, la synthèse de peptidoglycane et donc la formation du septum est nécessaire à la recombinaison Xer. La structure tertiaire du domaine N-terminal de FtsK n'est pas connue. D'autre part, par des expériences de double hybride il n'a pas été observé d'interaction du domaine N-terminal de FtsK avec lui-même (Grenga *et al.*, 2008). Il a été proposé un modèle selon lequel les complexes hexamériques actifs de FtsK ne pourraient pas être formés avant l'invagination du septum de part la faible concentration cellulaire en protéines et la faible constante d'association (Kennedy *et al.*, 2008). De plus, il a été proposé récemment que FtsK transporte l'ADN à travers un septum ouvert entre les deux cellules filles (Dubarry et Barre, 2010), limitant ainsi son activité aux étapes précédant la fermeture du septum de division. Il apparaît ainsi que l'activité de FtsK est restreinte aux étapes tardives de la septation, contrôlant la translocation temporellement. D'autre part, il est possible que le contrôle soit réciproque, et que FtsK puisse contrôler la division cellulaire. Il a notamment été proposé que l'activité de translocation soit impliquée dans la synthèse de peptidoglycane, dans une souche portant une inversion du chromosome (Lesterlin *et al.*, 2008). Ce contrôle par FtsK assurerait que la fermeture du septum ne puisse pas avoir lieu tant que les chromosomes ne sont pas ségrégués.

FtsK est également contrôlée dans l'espace, son activité est restreinte à une zone définie du chromosome. Récemment il a été mis en évidence dans l'équipe que le domaine d'activité de FtsK fait environ 350Kb, centré sur *dif* (Deghorain *et al.*, manuscrit en préparation). Pour cela, les auteurs ont mesuré la fréquence d'excision d'une cassette *dif-lacI-dif*, positionnée à différents loci du chromosome d'*E. coli*. Ils ont montré que le domaine d'activité est dépendant de sa séquence, et non de sa position par rapport au site *dif*, et de la localisation de FtsK au septum de division. Les contrôles de FtsK dans le temps et l'espace sont donc des contrôles étroitement liés, qui régulent précisément l'activité de la translocase à ADN.

3.6 FtsK, XerCD-*dif* et la décaténation des chromosomes

Bien que l'activité de la topoisomérase IV ne soit pas spécifique de site, il a été mis en évidence que *dif* est un site préférentiel de coupure par cette enzyme (Hojgaard *et al.*, 1999). Les auteurs ont montrés *in vivo* que la coupure à *dif* par la topoisomérase IV est dépendante de la présence des recombinases XerC et XerD. De plus, cette activité est indépendante de la division cellulaire et de la présence du domaine C-terminal de FtsK, essentiel à la recombinaison Xer par les protéines XerC et XerD (paragraphe III.3.7). Ils suggèrent ainsi que l'affinité particulière de la topoisomérase IV proviendrait de la structure formée par les recombinases complexées au site *dif*. D'autres auteurs ont montrés que le domaine C-terminal de la protéine FtsK interagit avec la sous-unité ParC *in vitro* et qu'il stimule l'activité de décaténation par la topoisomérase IV (Espeli *et al.*, 2003a). Le processus conduisant à cette stimulation n'est pas encore compris, cependant il a été démontré récemment *in vitro* qu'il est indépendant de l'activité de translocation de FtsK (Bigot et Mariani, 2010). D'autre part, il a également été mis en évidence un autre rôle joué par la protéine FtsK dans la décaténation des chromosomes. En effet, *in vivo*, dans un contexte où l'activité de la topoisomérase IV est altérée, FtsK active les systèmes de recombinaison spécifique de site XerCD/*dif* et Cre/*loxP* (lorsqu'il remplace le système XerCD/*dif*) qui, par plusieurs cycles de recombinaison, peuvent décaténer les chromosomes frères (Grainge *et al.*, 2007). Ces résultats *in vivo* confirment ce qui avait été proposé suite à des expériences de décaténation *in vitro* (Ip *et al.*, 2003).

Ainsi, bien qu'on retrouve des divergences dans la littérature quant aux rôles reliant la topoisomérase IV, le système de recombinaison Xer et la protéine FtsK lors de la décaténation des chromosomes, il apparaît qu'ils sont complémentaires et tous étroitement liés dans le temps et l'espace afin d'assurer la ségrégation des chromosomes frères à la fin de la réplication.

3.7 FtsK, XerCD-*dif* et la résolution des dimères de chromosomes

3.7.1 La formation de la synapse de recombinaison

Le premier niveau de contrôle exercé par la protéine FtsK consisterait en la formation de la synapse de recombinaison. En effet, guidée par les KOPS, la translocation par FtsK est toujours dirigée vers le site *dif*. De plus, les complexes XerCD/*dif* bloquent, spécifiquement, la translocation par FtsK (Graham *et al.*, 2010). De cette manière, FtsK transloque l'ADN

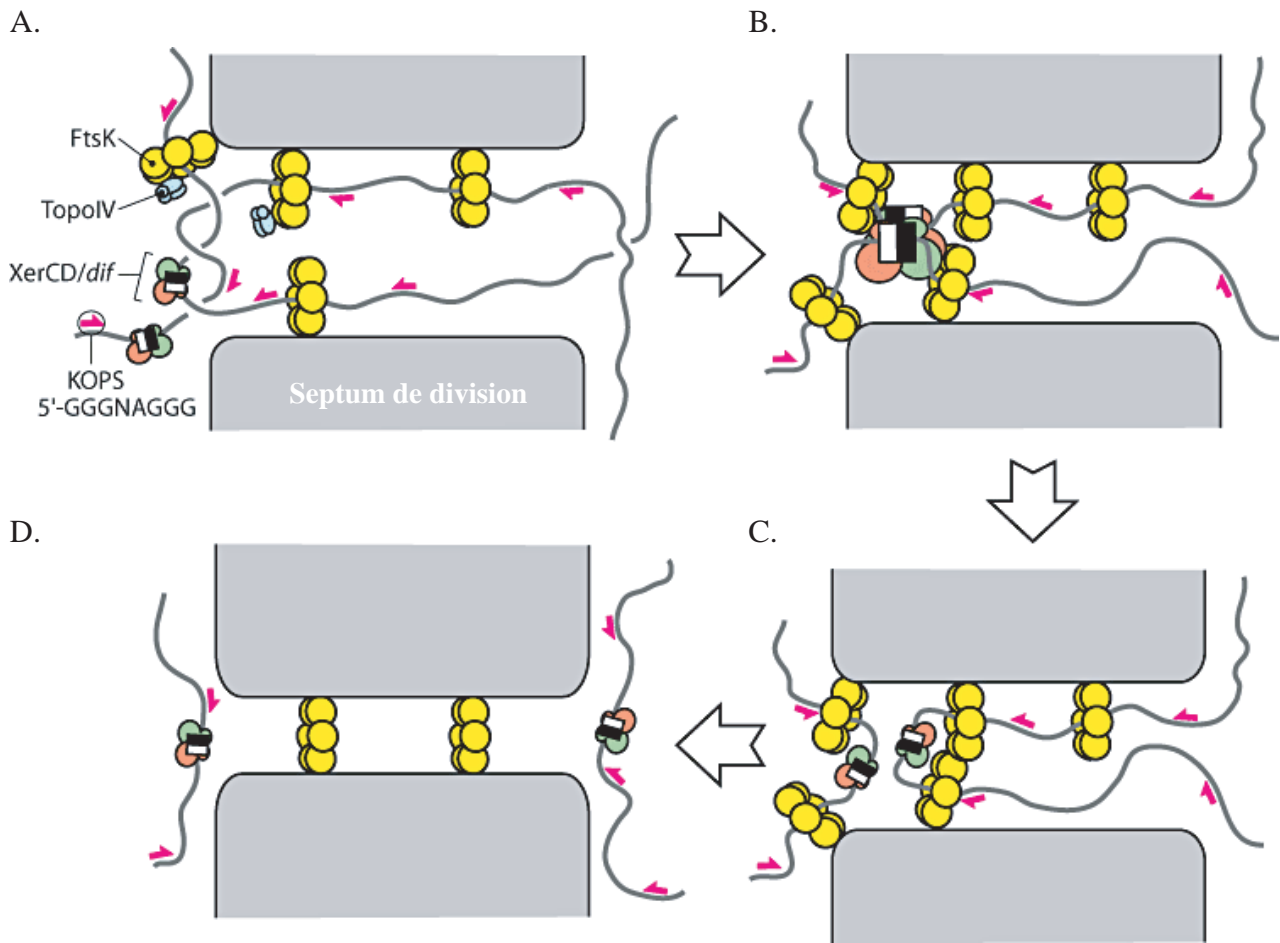


Figure 27. Ségrégation et résolution d'un dimère de chromosome.

A. Le septum de division, la protéine FtsK hexamérique, la Topoisomérase IV (TopoIV), les complexes XerC/D-*dif*, ainsi que des motifs KOPS sont indiqués. Les chromosomes frères sont sous forme dimérique et intercaténée. FtsK se charge sur l'ADN de manière orientée par la reconnaissance des KOPS et transloque l'ADN jusqu'aux complexes XerC/D-*dif* portés par les chromosomes frères. Ce processus permet de répartir les régions terminus des chromosomes frères de part et d'autre du septum de division et stimule également la décaténation par la Topoisomérase IV. **B.** En rapprochant les complexes XerC/D-*dif*, FtsK favorise la formation du complexe synaptique, puis active la réaction de recombinaison en interagissant avec XerD. **C.** Le dimère est alors résolu en monomères. FtsK continue de répartir les chromosomes frères dans les futures cellules filles pour assurer la fermeture du septum de division sans endommager d'ADN (**D**) (Bigot *et al.*, 2007).

jusqu'au deux sites *dif* portés par les chromosomes frères, les positionnant ainsi au septum de division. Permettant leur rapprochement, elle va donc favoriser la formation de la synapse de recombinaison (Capiaux *et al.*, 2002 ; Corre et Louarn, 2002 ; Bigot *et al.*, 2004). L'importance du positionnement des sites *dif* au septum de division a également été mise en évidence par le remplacement du système XerCD/*dif* par le système Cre/*loxP*. La substitution du site *dif* par le site *loxP* rend la résolution des dimères de chromosome par Cre sous la dépendance de la protéine FtsK (Capiaux *et al.*, 2002). *In vivo*, la résolution des dimères de chromosome est donc un mécanisme contrôlé dans le temps et l'espace par la protéine FtsK (Figure 27).

3.7.2 L'activation de la réaction de recombinaison

Le deuxième niveau de contrôle est l'activation de la réaction de recombinaison. Pour cela, FtsK remodelerait le complexe synaptique le rendant compétent pour la recombinaison. En effet, il semble que la conformation préférentielle de la synapse de recombinaison soit celle où les monomères de XerC sont actifs, puisque en absence de FtsK XerC est capable de catalyser le premier échange de brin conduisant à la formation de la jonction de Holliday (Barre *et al.*, 2000). Cependant cette réaction n'est pas productive, XerD s'avérant incapable de résoudre la jonction par l'échange de la deuxième paire de brins. En présence de FtsK, XerD catalyse le premier échange de brin, la jonction de Holliday étant par la suite résolue par XerC (Aussel *et al.*, 2002 ; Massey *et al.*, 2004). L'hypothèse communément admise est que l'activation de XerD, induite par FtsK, consisterait en une interaction directe entre les deux protéines et/ou en un remodelage du complexe de recombinaison.

Il a été mis en évidence que l'activation de la recombinaison est spécifique de l'espèce bactérienne (Yates *et al.*, 2003). Les auteurs ont réalisé des expériences *in vivo* en croisant les systèmes Xer-FtsK d'*H. influenzae* et d'*E. coli*, démontrant que l'activation de la recombinaison est similaire dans les deux cas et qu'elle est spécifique de l'espèce bactérienne. De plus, l'utilisation de chimères contenant différents fragments du domaine C-terminal de FtsK d'*H. influenzae* et d'*E. coli* leur a permis de mettre en évidence que la spécificité d'espèce dans l'activation provient du sous-domaine γ de la translocase (Yates *et al.*, 2003). Par la suite, la comparaison des séquences peptidiques associée à des tests *in vitro* d'interactions entre les deux protéines a servi à l'identification des acides aminés impliqués dans l'interaction physique entre XerD et le sous-domaine γ de FtsK (Figure 28) (Yates *et al.*, 2006). Toutefois, nous verrons dans la partie résultats de ce manuscrit, que la spécificité

<i>E. coli</i> FtsK γ	1264	ELDPLFDQAVQFV TEKRKA SISGVQRQFRIGYNRAARIIEQMEAQGIVS	1312
<i>V. cholerae</i> FtsK γ	894	ELDPLFDQVVEHV VE TRRGSVSGVQRRFKIGYNRAARIVEQLEAQGIVS	942
<i>H. influenzae</i> FtsK γ	854	ELDPLFDEVMDFV INTGTT SVSSIQRKFSVGFNRAARIMDQMEEQGIVS	902
<i>P. aeruginosa</i> FtsK γ	746	D-DPLYDEAVRFV TESRRA SISAVQRKCLKIGYNRAARMIEAMEMAGVVT	793

<i>E. coli</i> XerD	279	YTHVATERL RQLHQ HHHPRA	298
<i>V. cholerae</i> XerD	282	YTHVATERL KQLHNE HHHPRA	302
<i>H. influenzae</i> XerD	278	YTHVAKERL KRLHER FHPRG	297

Figure 28. Acides aminés impliqués dans l'interaction physique entre FtsK et XerD.

Les acides aminés importants pour l'interaction entre FtsK et XerD chez *E. coli* (en rouge) sont situés entre les hélices H1 et H2 du sous domaine γ de FtsK, et à l'extrême C-terminal de la recombinase XerD. Ces acides aminés ne sont pas conservés chez *H. influenzae*, et très peu sont conservés chez *V. cholerae* et *P. aeruginosa* (montrés en gras). Sur les séquences des recombinases XerD, la tyrosine catalytique est indiquée en gras.

d'espèce de l'activation de la recombinaison n'est pas une notion généralisable, et que l'activation peut avoir lieu lorsque les acides aminés ne sont pas conservés.

Il est proposé un modèle où l'activation consiste en une modification de l'interaction entre les domaines C-terminaux des recombinases XerC et XerD au niveau de l'échange d'hélices N (paragraphe II.2.2) (Yates *et al.*, 2006). Cet échange d'hélices est impliqué dans la communication entre les protéines. Il dicte la conformation active ou inactive des recombinases, assurant ainsi que les monomères diamétralement opposés soient dans la même configuration (Hallet *et al.*, 1999). La structure de la recombinase XerD montre que la tyrosine catalytique est mal positionnée pour attaquer le phosphate scissile. Les auteurs précisent que le positionnement correct du résidu catalytique ne nécessite qu'un faible changement au niveau de l'hélice N (Subramanya *et al.*, 1997). Toutefois, la structure a été obtenue en absence d'ADN, il est donc possible que la conformation de la recombinase soit différente lorsqu'elle est fixée à l'ADN. Cependant, les acides aminés impliqués dans l'interaction XerD/FtsK sont situés au niveau de cette hélice N, C-terminale. Les auteurs proposent donc que le sous-domaine γ , par son interaction avec XerD, puisse induire la modification nécessaire au positionnement correct de la tyrosine catalytique (Yates *et al.*, 2006). Ils proposent également que l'activation de XerD puisse être suffisante pour changer le complexe synaptique dans la conformation où XerD va catalyser la première coupure. Néanmoins, aucun argument structural ne vient appuyer leurs suppositions, et il est possible que le complexe synaptique nécessite une autre activation pour changer de conformation.

Récemment il a été mis en évidence l'importance des bases adjacentes au site *dif* dans la réaction de recombinaison. Il est proposé que les contacts que fait FtsK avec l'ADN stabiliseraient la protéine permettant ainsi une interaction entre la recombinase XerD et le sous-domaine γ suffisamment stable pour activer la recombinaison *in vivo* (Bonné *et al.*, 2009). Les auteurs proposent également que le positionnement de la translocase hexamérique sur l'ADN soit également impliqué dans le remodelage du complexe de recombinaison (Bonné *et al.*, 2009). Cependant, *in vitro*, le sous-domaine γ seul est capable d'activer la coupure par XerD (Yates *et al.*, 2006) et une protéine de fusion γ /XerD est active indépendamment de la présence de FtsK (I Grainge, communication personnelle).

Ces dernières années, de nombreuses études ont apporté une meilleure compréhension du contrôle du système Xer chromosomique. Cependant, ce contrôle de la recombinaison est complexe à étudier de part la multifonctionnalité de la protéine FtsK mais également parce qu'il intervient à différents niveaux. Ainsi, plusieurs points restent encore à être éclaircis. Il n'est pas encore établi si l'activation nécessite que le complexe synaptique soit formé ou s'il

est possible que l'activation de XerD puisse se faire avant la formation de la synapse de recombinaison. D'autre part, on ne sait pas si chacune des deux recombinases XerD du complexe interagit avec un sous-domaine γ et/ou FtsK, ou si une seule interaction est suffisante. Originellement, l'activation de la recombinase XerD a été mise en évidence *in vitro* par la nécessité de FtsK d'arriver au site de recombinaison par le bras XerD (Massey *et al.*, 2004). Ces expériences ont été réalisées avec deux fragments d'ADN de tailles différentes dont l'un est trop court pour que la translocase puisse se charger dessus, suggérant qu'une seule interaction est nécessaire *in vitro*.

Comme nous venons de le voir, les données obtenues jusqu'à présent ne permettent pas encore une bonne compréhension de l'activation de la recombinaison par FtsK. Ce contrôle de la recombinaison sera discuté dans la troisième partie de ce manuscrit car nous apportons des résultats complémentaires sur l'activation de la recombinaison *in vivo* par le sous-domaine γ de FtsK.

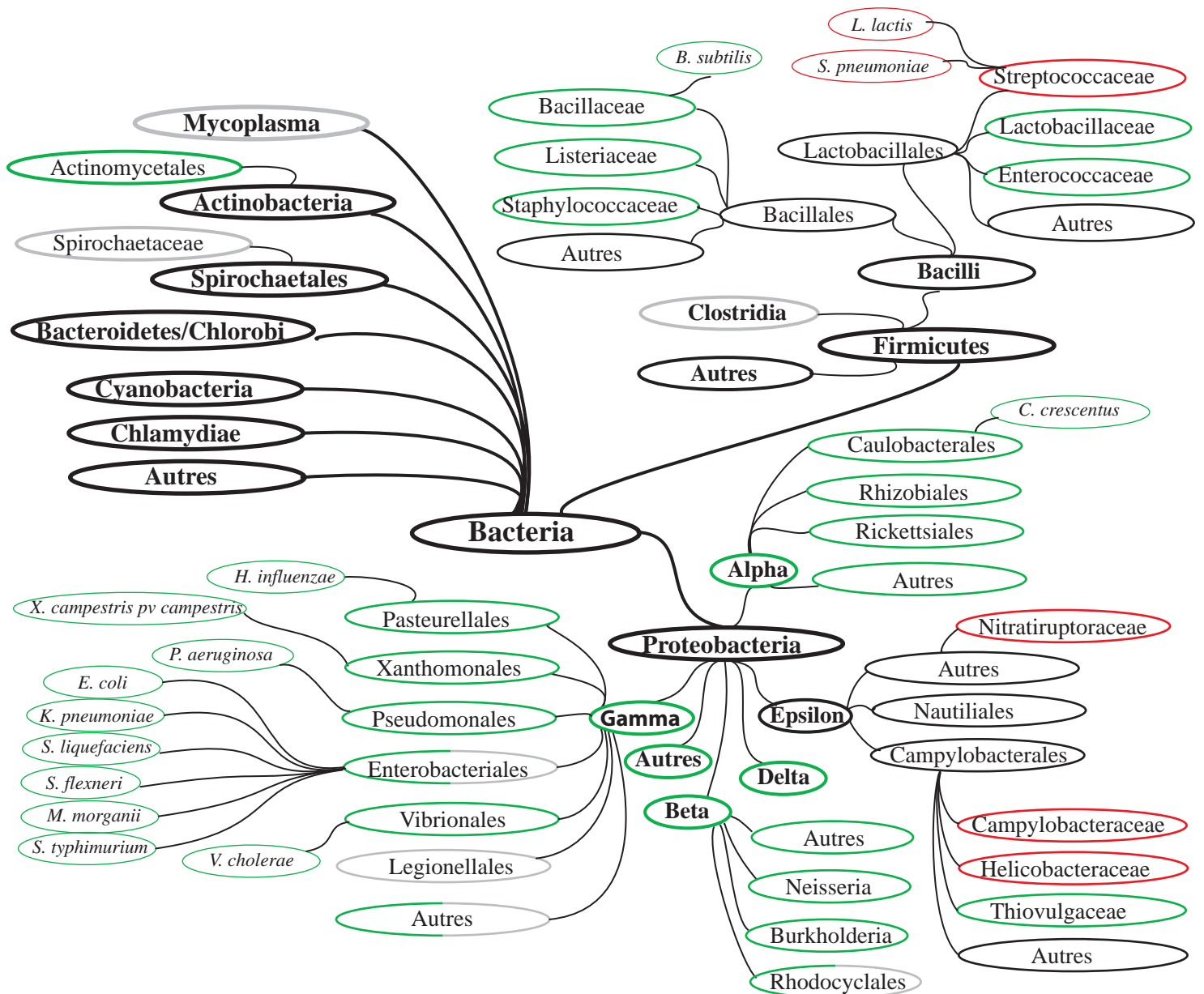


Figure 29. Conservation du système Xer dans le monde bactérien.

Représentation non exhaustive de la conservation d'un système Xer chez les bactéries. La présence d'un système Xer "classique", homologue à celui d'*E. coli*, est représentée en vert. La présence d'un système Xer "atypique" impliquant une seule recombinase à tyrosine, XerS ou XerH, et un site *dif_{SL}* ou *dif_H*, est indiquée en rouge. L'absence d'homologue des recombinases Xer et d'un site *dif* est indiquée en gris. Les 14 espèces pour lesquelles une analyse fonctionnelle du système Xer a été effectuée, sont indiquées.

IV. La conservation d'un système Xer chez les bactéries

1. Les recombinaisons Xer et le site *dif*

La résolution des dimères de chromosome est une fonction conservée chez la majorité des bactéries à chromosomes circulaires. A ce jour, deux types de machineries différentes ont été mis en évidence (Figure 29). La recherche systématique d'homologues des recombinaisons XerC et XerD et/ou du site *dif* a permis de révéler que la majorité des bactéries connues possèdent un système Xer « classique », c'est-à-dire homologue à celui d'*E. coli* (Figure 29) (Recchia et Sherratt, 1999 ; Chalker *et al.*, 2000 ; Hendrickson et Lawrence, 2007 ; Le Bourgeois *et al.*, 2007 ; Carnoy et Roten, 2009). Ces résultats sont appuyés par des études fonctionnelles, effectuées chez 11 espèces de protéobactéries et une espèce appartenant aux Firmicutes (Neilson *et al.*, 1999 ; Val *et al.*, 2008 ; Jensen, 2006 ; Yen *et al.*, 2002 ; Sirois et Szatmari, 1995 ; Sciochetti *et al.*, 2001 ; Massey *et al.*, 2006).

Le deuxième type de machinerie de recombinaison dédiée à la résolution des dimères de chromosome a été originellement décrit chez les Streptocoques (Le Bourgeois *et al.*, 2007), et fait l'objet du dernier paragraphe. Ce n'est pas un cas unique du monde bactérien puisqu'il a été récemment mis en évidence, dans la classe des epsilon-protéobactéries, un système Xer atypique, se rapprochant du système Xer des Streptocoques (Carnoy et Roten, 2009). En effet, celui-ci n'implique qu'une seule recombinaison à tyrosine, nommée XerH, qui agit sur un site divergent en séquence et en taille du site *dif* « classique », appelé *difH* (Figure 31). Alors que *difH* est homologue au site *dif_{SL}* des Streptocoques, il apparaît que XerH est phylogénétiquement éloigné de la recombinaison XerS, suggérant que les deux systèmes Xer sont différents (Figure 30) (Carnoy et Roten, 2009). Donc, un système Xer classique est retrouvé chez la grande majorité des protéobactéries et des firmicutes, et dans ces deux phyla on retrouve minoritairement des familles possédant un système Xer atypique.

Cependant, pour certaines espèces il n'a pas pu être mis en évidence d'homologues des recombinaisons Xer et/ou d'un site *dif* (Figure 29) (Recchia et Sherratt, 1999 ; Carnoy et Roten, 2009). Dans certains cas, comme les Spirochètes, ceci concorde avec l'absence de formation de dimère puisqu'elles portent un génome linéaire (Recchia et Sherratt, 1999). L'absence d'un système de résolution des dimères de chromosome a également été corrélée à la taille du génome. En effet, pour certaines bactéries endosymbiontes, il est proposé qu'elles aient perdu le système de résolution des dimères de chromosomes par réduction de leur

matériel génétique lors de la coévolution avec leur hôte (Carnoy et Roten, 2009). Enfin, dans le cas de deux espèces de Mycoplasma et d'une espèce de gamma-protéobactérie il a été mis en évidence l'absence d'un système de recombinaison homologue, ce qui implique qu'il n'y aurait pas chez ces bactéries de formation de dimères de chromosome (Recchia et Sherratt, 1999 ; Carnoy et Roten, 2009). Cependant, pour certains cas, aucune corrélation n'a pu être trouvée ne permettant pas ainsi de postuler que ces organismes aient perdu le système Xer ou ne l'aient jamais acquis. En effet, les Legionellales apparaissent comme une exception dans le sens où ce sont des bactéries qui possèdent un chromosome circulaire de taille importante et qu'elles codent pour une machinerie de recombinaison homologue (Carnoy et Roten, 2009). D'autre part, il apparaît que dans une population de Legionellales, une partie des cellules sont filamenteuses. Ce phénotype pourrait correspondre aux bactéries possédant un dimère de chromosome non résolu. Une autre explication pourrait être que ces bactéries codent pour un troisième type de machinerie de recombinaison qui n'a pas pu être mis en évidence par analogie avec les systèmes connus.

2. Le contrôle par la protéine FtsK

FtsK est une protéine conservée et son implication dans la division cellulaire et/ou la ségrégation des chromosomes a été caractérisée chez plusieurs espèces bactériennes (Wang *et al.*, 2006 ; Ausmees *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2007 ; Le Bourgeois *et al.*, 2007 ; Val *et al.*, 2008 ; Dedrick *et al.*, 2009). Peu de données concernent le contrôle de la résolution des dimères de chromosomes. Cependant, les études menées jusqu'à présent vont dans le sens d'une conservation du contrôle de la recombinaison Xer par FtsK, ainsi que d'un mode d'orientation de la translocation par des motifs biaisés sur le chromosome. L'étude la plus complète a été effectuée chez *Vibrio cholerae* où un mécanisme similaire à celui d'*E. coli* a été mis en évidence. En effet, FtsK_{Vc} active la réaction de recombinaison aux sites *dif1* et *dif2* en favorisant l'échange de la première paire de brin par XerD_{Vc}. De plus FtsK_{Vc} est orientée par des motifs KOPS (GGGNAGGG) qui sont biaisés sur les deux chromosomes de la même manière que chez *E. coli* (Val *et al.*, 2008), dirigeant FtsK_{Vc} vers le site de recombinaison. Les auteurs ont également mis en évidence que FtsK_{Vc} est capable d'activer la recombinaison à *dif* par les recombinases d'*E. coli*, appuyant ainsi le fait que le système est très conservé. De la même manière, la protéine FtsK_{Pa} de *P. aeruginosa* est capable d'activer *in vitro* la recombinaison à *dif*_{Ec} par les recombinases XerC_{Ec} et XerD_{Ec} alors que la protéine FtsK $\Delta\gamma$ _{Pa},

dépourvue du sous-domaine γ , en est incapable (Massey *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent ainsi un mode de fonctionnement similaire chez cette bactérie. Il a également été démontré *in vitro* que la protéine FtsK d'*H. influenzae* active la réaction de recombinaison par les recombinase XerC_{Hi} et XerD_{Hi} au site *dif*_{Hi}. Cependant, contrairement aux systèmes décrits précédemment, le contrôle de la recombinaison est spécifique d'espèce, c'est-à-dire que FtsK_{Hi} active mal le système Xer d'*E. coli*, et inversement (Yates *et al.*, 2003). Chez *Caulobacter crescentus*, il a été démontré que FtsK joue un rôle critique dans la division cellulaire et dans les étapes tardives de la ségrégation des chromosomes (Wang *et al.*, 2006). De plus, lorsque les domaines N-terminaux et C-terminaux sont exprimés indépendamment, 15 à 20% des cellules forment des filaments (Wang *et al.*, 2006). Bien qu'aucune corrélation avec le système Xer n'ait été suggérée, ce phénotype laisse penser à l'absence de résolution des dimères de chromosomes. En effet, chez *E. coli*, lorsqu'on exprime FtsK_C en *trans* dans une souche *fisK* Δ C les dimères de chromosome ne sont pas résolus. D'autre part, bien qu'aucune étude fonctionnelle n'ait été effectuée, des motifs biaisés sur le chromosome (GGGCRGGG), possédant toutes les caractéristiques des KOPS, ont été mis en évidence (Jensen, 2006). Enfin, *B. subtilis* possède deux protéines homologues à FtsK, SftA et SpoIIIIE. Bien qu'elles soient toutes les deux des translocases à ADN impliquées dans la ségrégation des chromosomes, elles jouent deux rôles distincts dans les cellules (Biller et Burkholder, 2009). SpoIIIIE est principalement impliquée lors de la sporulation de *B. subtilis*. SftA jouerait un rôle similaire à celui de FtsK chez *E. coli*. SpoIIIIE reconnaît les motifs SRS (pour *SpoIIIIE Recognition Sequence*), ayant pour séquence GAGAAGGG, orientant sa translocation (Ptacin *et al.*, 2008). L'orientation de la translocation par des motifs biaisés sur le chromosome apparaissant ainsi conservée dans la famille FtsK/SpoIIIIE, il est probable que SftA soit également guidée par de tels motifs mais jusqu'à présent aucune étude n'en fait état. L'implication d'une des translocases dans la résolution des dimères de chromosomes est controversée dans la littérature. En effet, il a tout d'abord été proposé que dans des souches mutées *sftA* Δ C, Δ *spoIIIIE*, ou *sftA* Δ C Δ *spoIIIIE* la recombinaison au site *dif*_{Bs} est inchangée, suggérant qu'aucune des deux translocases n'est impliquée dans la résolution des dimères de chromosomes (Sciochetti *et al.*, 2001). Cependant, il a récemment été mis en évidence que dans une souche mutée pour *sftA*, il y a une augmentation de la fréquence de cellules qui se divisent alors que les chromosomes ne sont pas ségrégués. De plus, ce phénomène est dépendant de la présence de *recA* suggérant donc une implication de SftA dans la résolution des dimères de chromosome (Biller et Burkholder, 2009).

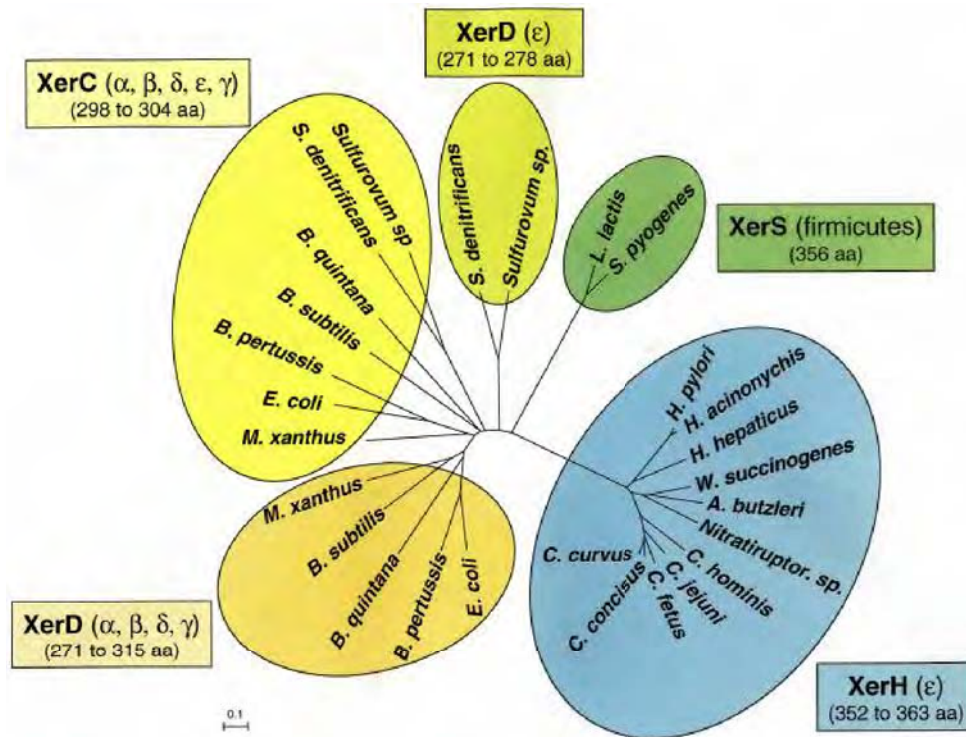


Figure 30. Analyse phylogénétique des recombinases XerC, XerD, XerH et XerS.

L'analyse a été effectuée pour des protéines XerC et XerD appartenant au phylum des protéobactéries. Les taxons auxquels elles appartiennent sont précisés. La taille des recombinases est indiquée en acides aminés pour chacun des groupes. La longueur des branches de l'arbre correspond à la distance évolutive (Carnoy and Roten, 2009).

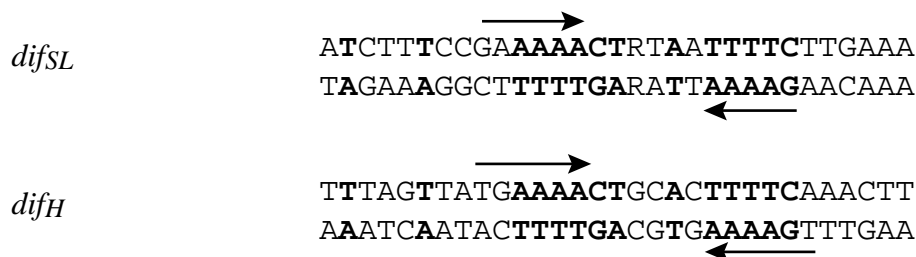


Figure 31. Séquences des sites de recombinaison *difSL* et *difH*.

Les sites de recombinaison *difSL* (en haut) et *difH* (en bas) ont une longueur de 31pb. Les bases en gras indiquent la conservation entre les deux séquences. Les flèches indiquent les séquences répétées et inversées.

3. Le système Xer chez les Streptocoques

La machinerie de recombinaison Xer chez les Streptocoques implique une seule recombinase XerS de 356 acides aminés. Elle est éloignée phylogénétiquement des recombinases XerC, XerD et XerH (Figure 30). XerS recombine au niveau du site *dif_{SL}* (Figure 31) divergent en taille et en séquence des sites *dif* décrits (Le Bourgeois *et al.*, 2007). Le site *dif_{SL}* n'ayant pas pu être déterminé par homologie avec les sites *dif* « classiques », les auteurs ont recherché dans la région du terminus, à la jonction du biais G+C, une séquence très conservée chez les Streptocoques et présente en une seule copie sur le chromosome. Puis, pour affiner leur recherche, des expériences d'intégration de plasmide dans les chromosomes de *L. lactis* et de *S. pneumoniae* leur ont permis de définir la séquence minimale nécessaire à la réaction de recombinaison. Ainsi, *dif_{SL}* est long de 31pb et possède des bras de fixation de la recombinase asymétriques composés de séquences imparfaitement répétées et inversées (Figure 31) (Le Bourgeois *et al.*, 2007).

La nécessité d'une seule recombinase a été démontrée dans un mutant $\Delta xerS$ de *S. pneumoniae*, et dans une souche d'*E. coli* où la machinerie de recombinaison a été remplacée par celle des Streptocoques. Le système Xer des Streptocoques possède une autre particularité puisqu'il se présente sous la forme d'un module génétique. En effet, le gène *xerS* est situé en aval du site de recombinaison, et cette organisation est conservée dans toute la famille (Le Bourgeois *et al.*, 2007).

Le système Xer des Streptocoques est sous le contrôle de la protéine FtsK et ce, indépendamment de l'espèce. En effet, dans un mutant de *S. pneumoniae* *ftsK* Δ C, la fréquence d'intégration d'un plasmide portant le site *dif_{SL}* est fortement diminuée. De la même manière, dans une souche d'*E. coli* *ftsK* Δ C, la fréquence de recombinaison à *dif_{SL}* est considérablement diminuée. Cependant, la recombinaison n'est pas totalement abolie dans un mutant *ftsK* Δ C, comme c'est le cas chez *E. coli* (Bigot *et al.*, 2004), puisqu'elle équivaut à 1% de recombinaison d'une souche sauvage. Ceci indique que des complexes synaptiques productifs peuvent être formés en absence du domaine C-terminal de FtsK. Ce résultat pose le problème de savoir si FtsK active la recombinaison par une interaction directe avec XerS, comme c'est le cas chez *E. coli*. En effet, il est moins évident de comprendre le mécanisme de cette activation quand les quatre protéines du complexe synaptique sont identiques. Dans le cas d'*E. coli*, ce contrôle assure un ordre d'échange de brins et une coordination des réactions de coupure. De plus, les acides aminés impliqués dans cette interaction ne sont pas conservés

chez *L. lactis*. Cependant comme nous l'avons vu précédemment dans le cas de *V. cholerae* ou de *P. aeruginosa*, bien que les acides aminés ne soient pas conservés, on retrouve une activation de la recombinase.

Le système Xer des Streptocoques est le seul système de résolution des dimères de chromosome impliquant une seule recombinase à tyrosine à avoir fait l'objet d'une étude fonctionnelle. Nous avons voulu approfondir ces connaissances par l'étude moléculaire de ce système de recombinaison. Notamment, nous nous sommes intéressés à l'organisation du site de recombinaison qui est atypique (Figure 31). En effet, généralement les systèmes impliquant une seule recombinase, comme c'est le cas pour le système Cre/*loxP* ou Flp/*FRT*, possèdent un site de recombinaison dont les deux bras de fixation sont des séquences inversées et parfaitement répétées. Le site *dif_{SL}* est particulier puisqu'il est asymétrique au niveau de la longueur et de la séquence des bras de fixation.

D'autre part, nous avons voulu valider le fait que XerS est une recombinase à tyrosine, en démontrant ses activités de coupure et d'échange de brins, et qu'elle ne nécessite pas d'autres facteurs accessoires. Nous avons également essayé de décrire le contrôle de la réaction de recombinaison par la protéine FtsK. Le système XerS/*dif_{SL}* étant sous le contrôle de la protéine FtsK d'*E. coli* lorsqu'il remplace le système XerCD/*dif*, nous avons voulu définir si les différents contrôles décrits chez *E. coli* sont conservés. Notamment, le système impliquant une seule recombinase, il était intéressant de savoir si l'activation de la recombinase par le sous-domaine γ était conservée.

La nécessité de FtsK d'arriver au site de recombinaison est un point important du contrôle de la recombinaison Xer. De plus, le mode d'orientation par des motifs biaisés sur le chromosome apparaît être conservé chez plusieurs espèces bactériennes. Nous avons donc également décidé de rechercher des motifs pouvant orienter la translocation de la protéine FtsK chez *L. lactis*.

II- RESULTATS

II- RESULTATS

Les travaux de thèse que j'ai réalisés sur la résolution des dimères de chromosome chez les Streptocoques peuvent se scinder en deux axes. Dans un premier temps, j'ai étudié la réaction de recombinaison XerS/*dif_{SL}* de *L. lactis* ainsi que son contrôle par la translocase FtsK_{SL}. Je me suis intéressée à la machinerie de recombinaison et notamment à définir plus précisément le site *dif_{SL}*. Je voulais également comprendre l'importance de l'asymétrie des bras de fixation pour un système de recombinaison à une seule recombinase. La réaction de recombinaison étant contrôlée par la protéine FtsK_{SL}, je voulais définir si les différents contrôles décrits chez *E.coli* étaient conservés. Dans un deuxième temps je me suis intéressée à l'orientation de la translocation de FtsK_{SL}. Plusieurs évidences laissaient penser que, s'ils existaient, les motifs chromosomiques potentiellement reconnus étaient différents de ceux mis en évidence jusqu'à présent chez d'autres espèces. Je me suis donc attachée à déterminer les motifs pouvant diriger la translocase FtsK_{SL} sur le chromosome.

I. Mise en place des outils

Lorsque je suis arrivée en thèse, il avait été mis en évidence que XerS est impliquée dans la recombinaison Xer. Néanmoins, un doute subsistait quant à l'implication dans le système Xer d'une autre protéine, YnbA. YnbA est une protéine conservée chez les Streptocoques et annotée comme une recombinase à tyrosine. Elle a été originellement identifiée comme la recombinase XerD chez *S. pneumoniae* (Reichmann et Hakenbeck, 2002). Cependant, cette protéine est tronquée au niveau de son extrémité carboxy-terminale, juste après la tyrosine conservée. De ce fait, il lui manque l'hélice C-terminale impliquée dans les interactions entre monomères de recombinase.

Les gènes *xerS* et *ynbA* ont été clonés, avant mon arrivée, dans le vecteur d'expression pFSKB3X. Ce clonage confère aux protéines XerS et YnbA une étiquette en N-terminal constituée d'une succession de 6 histidines suivie de la séquence de l'épitope Flag puis d'un site de coupure, TEV, permettant d'enlever la totalité de l'étiquette. De plus, un premier essai de purification par chromatographie d'affinité par immobilisation d'un atome métallique (IMAC pour *Immobilized Metal Affinity Chromatography*) via l'étiquette histidine avait été effectuée. Pour vérifier ou confirmer l'implication de chacune des deux protéines dans la

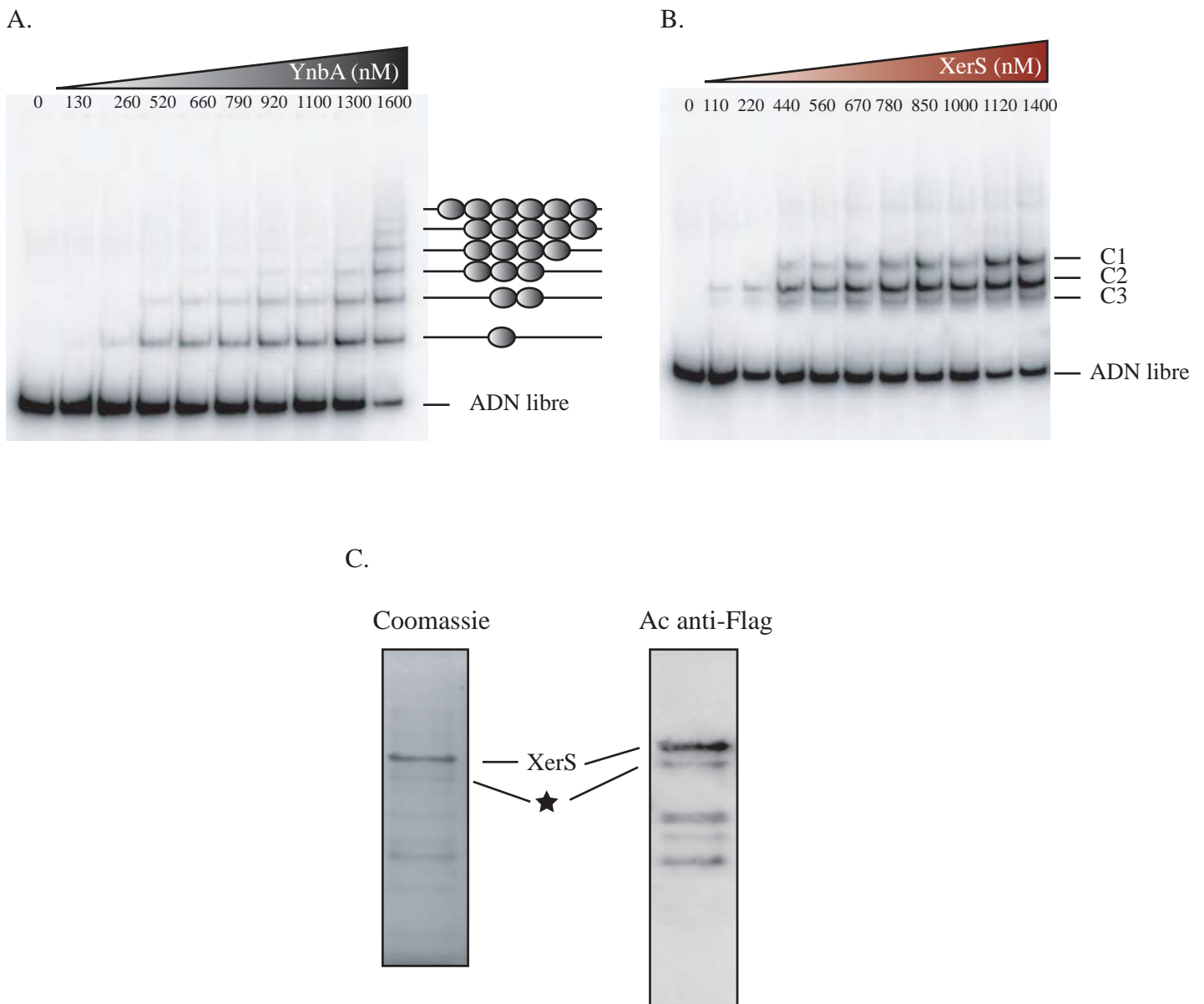


Figure 32. Interactions non spécifique et spécifique de YnbA et XerS avec l'ADN.

Un ADN de 179pb portant le site *dif_{SL}* a été mis en présence de concentrations croissantes en protéine YnbA (**A**) et XerS (**B**). La concentration en protéines de l'échantillon utilisé est indiquée en nM au dessus de chacune des pistes. L'ADN libre et les complexes nucléoprotéiques formés sont indiqués, pour XerS par C1, C2 et C3, et pour YnbA par un schéma. Les traits noirs représentent le fragment d'ADN double brin, et les cercles gris représentent un monomère ou un oligomère de YnbA. **C.** L'extrait protéique de XerS utilisé a été analysé par SDS-PAGE et coloré au bleu de Coomassie (à gauche) ou transféré sur membrane et révélé par un anticorps (Ac) anti-Flag (à droite). La protéine XerS recombinante est indiquée. Quatre formes tronquées en C-terminal de XerS sont révélées par l'anticorps anti-Flag. L'étoile indique la forme tronquée de la protéine qui forme le complexe C3 sur la figure 32B.

recombinaison Xer, j'ai tout d'abord regardé par des expériences de retards sur gel la fixation de YnbA (Figure 32A) et de XerS (Figure 32B) sur un ADN portant le site *dif_{SL}*. Le profil obtenu avec la protéine YnbA est caractéristique d'une fixation non spécifique à l'ADN (Figure 32A), ce qui a été confirmé par la suite par l'utilisation d'un ADN ne portant pas le site *dif_{SL}*. En effet, on observe, en fonction de l'augmentation de la concentration en protéine, une échelle d'ADN retardé (Figure 32A). Ceci s'explique par le fait que le complexe de plus forte mobilité électrophorétique correspond à un ADN associé à un monomère ou à un oligomère de protéine, le complexe au dessus correspond à un ADN et un dimère ou deux oligomères de protéines, etc. Associé au fait que *in vivo*, ni l'absence, ni la présence de YnbA ne modifie la fréquence de recombinaison au site *dif_{SL}*, ce résultat nous a permis de confirmer que YnbA n'est pas une recombinase du système Xer chez les Streptocoques (Le Bourgeois *et al.*, 2007).

Le profil obtenu avec XerS révèle, à fortes concentrations en protéines, trois complexes nucléoprotéiques C1, C2 et C3 (Figure 32B). Néanmoins, l'échantillon de protéines que j'utilisais n'était pas pur, puisque après séparation sur SDS-PAGE on peut voir un grand nombre de contaminants dont une partie, révélée par des anticorps anti-Flag, correspond à des formes tronquées en C-terminal de la protéine XerS (Figure 32C). Notamment, j'ai pu mettre en évidence par la suite que le complexe C3 est formé par la fixation au site *dif_{SL}* d'une de ces formes tronquées de la recombinase XerS (Figure 32C). J'ai donc entrepris de mettre au point les conditions de purification mais également d'expression de la protéine recombinante, XerS se retrouvant majoritairement dans la fraction insoluble après lyse des cellules (Figure 33A).

1. Conditions d'expression et de purification de XerS

Dans le plasmide d'expression utilisé, le gène *xerS* est sous le contrôle du promoteur pT7. La souche d'*E. coli* BL21(DE3) possède le gène codant pour l'ARN polymérase T7 sous le contrôle de l'opéron lactose. Ainsi, lorsqu'on transforme la souche BL21(DE3) avec notre plasmide d'expression, le gène d'intérêt est inductible par l'IPTG. J'ai tout d'abord testé différentes conditions d'expression puisqu'une trop forte expression peut être une des causes de l'insolubilité des protéines. Pour cela, j'ai fait varier la température d'incubation, la concentration d'inducteur (IPTG), la présence ou l'absence de glucose dans le milieu de culture (pour réprimer l'opéron lactose) et le temps d'induction. Les meilleures conditions

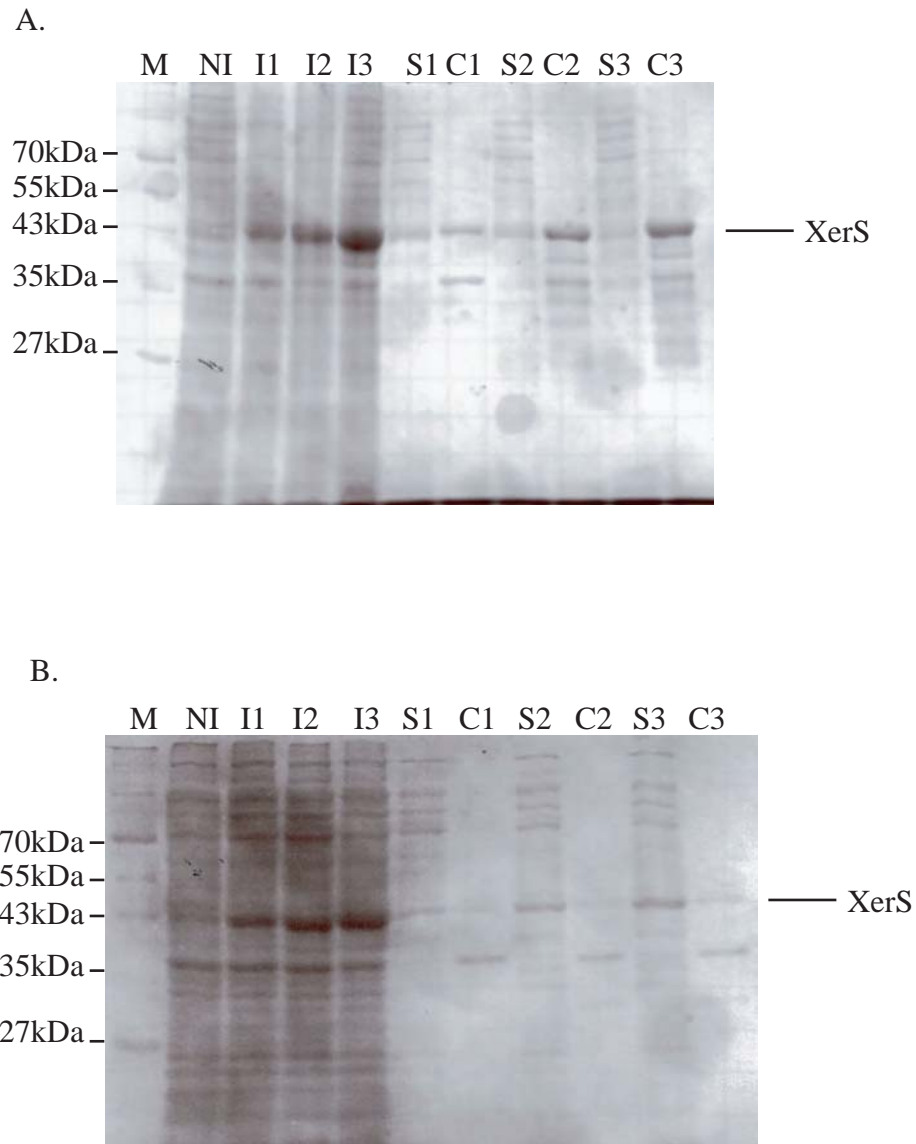


Figure 33. Mise au point des conditions d'expression de la protéine XerS recombinante.

Vérification par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie, de l'induction de l'expression et de la solubilité de la recombinase XerS. **A.** La culture cellulaire a été incubée à 37°C puis induite à 0,1mM d'IPTG pendant 3 heures à 37°C. Un échantillon a été prélevé au bout d'1h, de 2h et de 3h d'induction. La protéine XerS est indiquée, et est retrouvée majoritairement dans la fraction insoluble. **B.** Les cellules ont été mises en culture à 42°C puis induites par 0,1mM d'IPTG pendant 3h à température ambiante. La protéine est retrouvée majoritairement dans la fraction soluble. M : marqueur de taille ; NI : non induit ; I : induit ; C : culot ; S : surnageant ; 1, 2, et 3 : au bout d'1h, de 2h, et de 3h d'induction, respectivement.

obtenues consistent à mettre en culture les cellules à 42°C jusqu'à la DO₆₀₀ attendue (0,5-0,6) puis à passer à température ambiante pour l'induction (B. Hallet, UCL, communication personnelle). Ainsi, même après 3h d'induction à 0,1mM IPTG on retrouve une fraction infime de protéines insolubles (Figure 33B). L'idée sous jacente à ces conditions de cultures et d'induction est que, en plus de diminuer le métabolisme de la bactérie, et donc de ralentir la transcription et le traduction des protéines en induisant à température ambiante, les cellules ont produit à 42°C des protéines chaperonnes, qui vont aider au repliement des protéines et notamment à celui de notre protéine d'intérêt.

Afin d'améliorer la purification de la protéine XerS recombinante j'ai tout d'abord ajouté une étape de chromatographie d'affinité via l'étiquette Flag. Cependant, il s'est avéré que la protéine n'est pas retenue par les anticorps anti-Flag. Comme il est possible, par Western Blot, de révéler la protéine dénaturée par des anticorps anti-Flag (Figure 32C), il semble que la conformation native de la protéine étiquetée ne rende pas accessible l'épitope Flag. XerS étant une protéine affine pour l'ADN, j'ai décidé, après purification sur colonne de Nickel, d'ajouter une chromatographie d'affinité avec une colonne d'héparine. Cette deuxième étape a permis d'enlever une grande partie des contaminants, mais deux formes tronquées de la protéine sont également retenues par la colonne. La dernière étape a consisté en une colonne de filtration sur gel, afin de séparer les différentes formes de la protéine recombinante (Figure S1, Nolivos *et al.*, 2010).

La protéine catalytiquement inactive, XerSY341F, se comporte de la même manière que la protéine sauvage, et a été purifiée suivant le même protocole.

2. Purification de la protéine FtsK_{SL}

Afin d'étudier l'implication de la protéine FtsK_{SL} dans le contrôle de la recombinaison XerS/*dif*_{SL}, j'ai tout d'abord analysé la séquence protéique. J'ai défini les quatre domaines transmembranaires putatifs par l'utilisation de logiciels de prédictions (MINNOU (Cao *et al.*, 2006), TMpro (Ganapathiraju *et al.*)). Par comparaison de séquences, j'ai pu mettre en évidence les motifs Walker A et Walker B qui sont essentiel à l'activité ATPase de la protéine. Enfin, la prédiction de structure secondaire (Predator, <http://mobylye.pasteur.fr/>), associée à la comparaison de séquence avec la protéine FtsK d'*E.coli*, m'a permis de définir les différents domaines protéiques putatifs (Figure 34). J'ai cloné dans le vecteur d'expression pFSKB3X la séquence codant les domaines « linker » et C-terminal. La purification a été

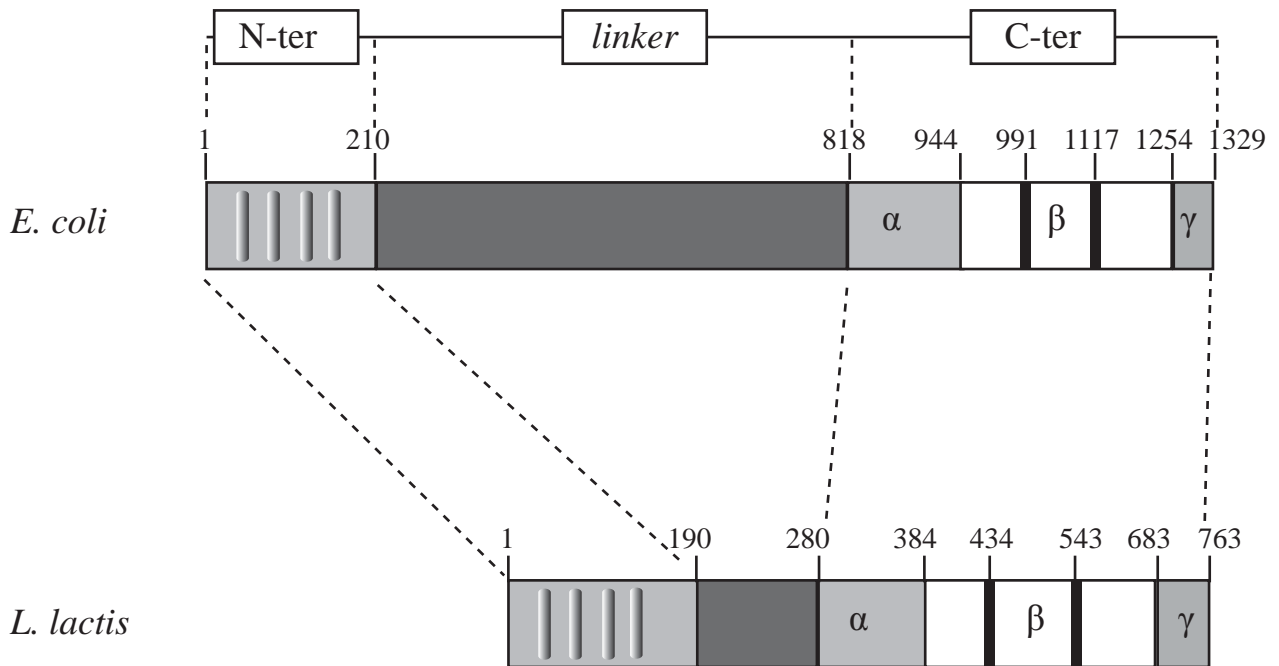


Figure 34. Représentation schématique des protéines FtsK d'*E. coli* et de *L. lactis*.

Les domaines N-terminal (gris clair), « linker » (gris foncé) et C-terminal (gris clair et blanc) sont indiqués. Les sous-domaines α (gris clair), β (blanc), et γ (gris clair), sont indiqués. Les motifs Walker A et Walker B sont schématisés par deux traits dans le sous-domaine β . La position sur la séquence protéique de chaque domaine, sous-domaine, et motif, est indiquée en acides aminés au dessus du schéma.

effectuée en deux étapes, par passage sur colonne de nickel suivie d'une colonne d'héparine. Afin de vérifier l'activité de translocation de l'ADN de la protéine purifiée, j'ai réalisé différents tests ATPase, ainsi que des expériences de molécule unique (Ptacin *et al.*, 2008) par utilisation de pinces magnétiques, mais aucune activité n'a pu être détectée.

L'échantillon de protéines a ensuite été analysé par diffusion dynamique de la lumière, DLS (*Dynamic Light Scattering*). Cette technique permet la mesure de la diffusion de lumière émise par les particules sphériques présentes dans l'échantillon, après irradiation par un laser. Dues au mouvement brownien des molécules en solution, des fluctuations de l'intensité de diffusion sont observées. Les grosses particules ayant un mouvement plus lent que les petites, il est possible de corrélérer les mesures de diffusion de lumière avec le diamètre des molécules. Cette technique nous a ainsi permis de définir que l'échantillon protéique est monodispersé et que le diamètre des molécules est d'environ 15nm. La structure d'un hexamère de domaines C-terminaux de la protéine FtsK de *P. aeruginosa*, dépourvue du sous-domaine gamma, révèle un diamètre de 12nm (Massey *et al.*, 2006). Nous observons une population de molécules d'un diamètre d'environ 15nm, ce qui suggère fortement que la protéine FtsK_{SL} purifiée est sous forme d'hexamères en solution. Ceci explique qu'aucune activité n'ait pu être détectée. En effet, il semble peu probable que sous forme hexamérique, la protéine puisse se charger sur l'ADN.

Si on regarde les différentes formes de FtsK qui ont été purifiées, FtsK_{50C} d'*E. coli* (Aussel *et al.*, 2002), SpoIIIE_C de *B. subtilis* (Ptacin *et al.*, 2008) et FtsK_{LC} de *P. aeruginosa* dont la moitié du « linker » a été enlevée (Massey *et al.*, 2006), aucune ne possède le domaine « linker » entier. Il n'a donc peut être pas été stratégique de conserver entièrement ce domaine dans la construction que j'ai réalisée. Néanmoins, les différentes formes utilisées rendent compte de l'incapacité de prédire le comportement, après purification, des formes tronquées des protéines appartenant à la famille FtsK. Afin d'obtenir une protéine FtsK_{SL} monomérique en solution, il faudrait réaliser plusieurs constructions en diminuant la séquence du linker ou en l'enlevant entièrement jusqu'à l'obtention d'une protéine soluble et monomérique après purification.

3. Utilisation des sous-domaines γ de FtsK de *L. lactis* et d'*E. coli*

Le sous-domaine γ de la protéine FtsK d'*E. coli* étant le domaine d'activation et de reconnaissance des KOPS, j'ai réalisé des constructions afin de produire le sous-domaine γ

des protéines FtsK de *L. lactis* et d'*E. coli* indépendamment. Les séquences codant pour les deux sous-domaines γ (AA 685 à 763 pour *L. lactis* et 1254 à 1329 pour *E. coli*) ont été insérées dans le vecteur pFSKB3X, conférant aux protéines l'étiquette His-Flag à l'extrémité N-terminale. L'expression a été réalisée comme décrit pour XerS et la purification a été effectuée en une étape, par passage sur colonne de Nickel. Les gènes fusionnés à la séquence de l'étiquette ont ensuite été clonés dans le vecteur pBAD24, sous le contrôle du promoteur arabinose, afin de les exprimer *in vivo* chez *E.coli*.

II. Etude du système XerS/*dif*_{SL} de *L. lactis*

1. Présentation de l'article

1.1- Introduction

La machinerie de recombinaison Xer des Streptocoques est atypique. Elle implique une seule recombinase qui agit sur un site de recombinaison particulier. D'autre part, lorsqu'on remplace, chez *E. coli*, le système XerCD/*dif* par le système XerS/*dif*_{SL}, ce dernier est dépendant de la translocase FtsK d'*E. coli* (Le Bourgeois *et al.*, 2007). Les différents contrôles de la recombinaison mis en évidence chez *E. coli* indiquent, notamment, qu'il y a une spécificité d'espèce pour l'activation de la recombinase XerD par le sous-domaine γ de FtsK. Les acides aminés montrés comme étant impliqués dans cette activation (Yates *et al.*, 2006) n'étant pas conservés chez *L. lactis*, ce résultat nous a amené à nous poser la question du contrôle de la recombinaison XerS/*dif*_{SL} par la protéine FtsK.

Dans cet article, nous avons dans un premier temps étudié *in vitro*, la machinerie de recombinaison du système Xer de *L. lactis*. Par des expériences de retards sur gel et d'empreintes à la DNaseI, nous avons décrit la fixation de XerS sur le site *dif*_{SL} ainsi que le mode d'assemblage du complexe nucléoprotéique. Nous nous sommes également intéressé à la réaction d'échange de brins en utilisant l'intermédiaire réactionnel qui est une jonction de Holliday. Dans un deuxième temps, nous nous sommes attaché à étudier le contrôle de la recombinaison *in vivo* chez *E. coli*. Pour cela, nous avons utilisés plusieurs mutants du gène codant pour la protéine FtsK, afin de découpler les différents contrôles exercés sur le système Xer. Nous avons également utilisé une protéine FtsK chimérique, dont le domaine C-terminal a été remplacé par celui de la protéine FtsK_{SL} de *L. lactis*, afin de comparer les activités régulatrices des deux protéines.

1.2- Conclusions

Nous avons mis en évidence que XerS se fixe de manière asymétrique et coopérative sur le site *dif*_{SL}. La recombinase a une meilleure affinité pour le bras de fixation gauche que pour le droit, ce qui suggère un ordre d'assemblage défini sur le site de recombinaison. Les réactions de coupure et d'échange de brins se font également de manière asymétrique. La

jonction de Holliday est préférentiellement résolue par l'échange des brins inférieurs, ce qui indique que c'est la recombinase positionnée sur le bras de fixation droit qui catalyse majoritairement la réaction d'échange des brins. Ainsi, bien que la machinerie de recombinaison soit différente, on retrouve des similitudes avec le système XerCD/*dif* dans le mode de fixation au site et dans la résolution de la jonction de Holliday. Ces résultats indiquent que l'asymétrie du site *dif_{SL}* est suffisante pour contrôler la réaction de recombinaison, qui est dicté dans les Xer « classiques » par l'asymétrie du site et la présence de deux recombinases différentes.

Chez *L. lactis* comme chez *E. coli*, la résolution des dimères de chromosomes est sous la dépendance de la protéine FtsK. Par l'utilisation des différents allèles de *ftsK*, *ftsK^{WT}*, *ftsK Δ C*, *ftsK Δ γ* , *ftsK_{KOPS}blind* et *ftsK_{ATP}⁻*, nous avons mis en évidence que l'activité de translocation de l'ADN est nécessaire, et que FtsK doit atteindre le site *dif_{SL}* pour que la réaction de recombinaison soit productive. D'autre part, une protéine FtsK chimérique qui contient le domaine C-terminal de *L. lactis* est capable d'activer les systèmes XerS/*dif_{SL}* et XerCD/*dif*. Ces résultats suggèrent donc fortement que les contrôles exercés sur les deux systèmes sont identiques. Cependant la faible conservation, sur XerS et FtsK_{SL}, des résidus importants pour l'activation de XerD par le sous-domaine γ de FtsK, nous a amené à étudier plus en détail ce contrôle de la réaction de recombinaison. Pour cela, nous avons dissocié les activités de translocation de l'ADN et d'activation par interaction directe avec la recombinase, en produisant le sous-domaine γ indépendamment du reste de la protéine. Les résultats obtenus montrent que le sous-domaine γ de FtsK d'*E. coli* active la recombinaison XerCD/*dif* et que le sous-domaine γ de FtsK_{SL} de *L. lactis* n'active aucun des deux systèmes. Ainsi, il apparaît que pour le système Xer des Streptocoques, il n'y a pas une activation de la recombinaison par interaction directe entre le sous-domaine γ et la recombinase XerS comme décrit chez *E. coli*.

D'autre part, ce résultat apporte des données complémentaires sur l'interaction XerD-FtsK γ . En effet, les expériences ont été réalisées dans des souches portant les allèles *ftsK Δ C* et *ftsK Δ γ* , c'est-à-dire que dans le premier cas, il n'y a pas le domaine impliqué dans la translocation et l'activation, et dans le deuxième cas, il n'y a ni reconnaissance des KOPS, ni activation de XerD. Les résultats obtenus indiquent donc que l'activation par le sous-domaine γ ne nécessite pas l'activité de translocation de l'ADN de FtsK, ni que le sous-domaine γ soit relié au reste de la translocase.

1.3- Article

Are two better than one? Analysis of an FtsK/Xer recombination system that uses a single recombinase

Sophie Nolivos^{1,2}, Carine Pages^{1,2}, Philippe Rousseau^{1,2}, Pascal Le Bourgeois^{1,2} and François Cornet^{1,2,*}

¹Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaire, CNRS and ²Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, F-31000, Toulouse, France

Received March 22, 2010; Revised May 18, 2010; Accepted May 19, 2010

ABSTRACT

Bacteria harbouring circular chromosomes have a Xer site-specific recombination system that resolves chromosome dimers at division. In *Escherichia coli*, the activity of the XerCD/*dif* system is controlled and coupled with cell division by the FtsK DNA translocase. Most Xer systems, as XerCD/*dif*, include two different recombinases. However, some, as the *Lactococcus lactis* XerS/*dif_{SL}* system, include only one recombinase. We investigated the functional effects of this difference by studying the XerS/*dif_{SL}* system. XerS bound and recombined *dif_{SL}* sites *in vitro*, both activities displaying asymmetric characteristics. Resolution of chromosome dimers by XerS/*dif_{SL}* required translocation by division septum-borne FtsK. The translocase domain of *L. lactis* FtsK supported recombination by XerCD/*dif*, just as *E. coli* FtsK supports recombination by XerS/*dif_{SL}*. Thus, the FtsK-dependent coupling of chromosome segregation with cell division extends to non-rod-shaped bacteria and outside the phylum Proteobacteria. Both the XerCD/*dif* and XerS/*dif_{SL}* recombination systems require the control activities of the FtsK γ subdomain. However, FtsK γ activates recombination through different mechanisms in these two Xer systems. We show that FtsK γ alone activates XerCD/*dif* recombination. In contrast, both FtsK γ and the translocation motor are required to activate XerS/*dif_{SL}* recombination. These findings have implications for the mechanisms by which FtsK activates recombination.

INTRODUCTION

Most known bacteria have circular chromosomes. This circular form facilitates the termination of replication, but renders recombination-based repair hazardous, because sister chromatid exchanges between circles may result in dimer formation [reviewed in (1,2)]. Chromosome dimers cannot be segregated to daughter cells and must therefore be resolved, to generate monomers, before cell division. Xer site-specific recombination systems are responsible for this dimer resolution.

The resolution of chromosome dimers has been studied mostly in *Escherichia coli* [reviewed in (1,3,4)]. It involves two site-specific recombinases of the Y-recombinase family, XerC and XerD, acting at a recombination site, *dif*, located in the termination of replication region (Figure 1A). In contrast to the XerCD/*dif* system, most systems driven by Y recombinases, for example the *Cre/loxP* model system from plasmid P1, use a single recombinase (5). Recombination occurs in a complex containing four monomers of recombinase bound to two recombination sites synapsed in an antiparallel configuration (Figure 1B). A first pair of recombinases cuts and transfers a first pair of strands, producing a Holliday-junction (HJ)-containing intermediate. Subsequent catalysis by the second pair of recombinases resolves this intermediate to generate recombinant molecules. In the XerCD/*dif* system, the synaptic complex consists of two XerC and two XerD monomers bound to two *dif* sites. The *dif* site contains binding sites for XerC and XerD separated by a 6-bp central region (CR), at the edges of which, strand exchanges are catalysed (Figure 1A). XerC or XerD may catalyse the exchange of the first pair of strands, depending on external controls imposed on the synaptic complex (6,7). *In vivo* and *in vitro* studies have shown that the XerCD/*dif* complex naturally tends to

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 561 335 985; Fax: +33 561 335 886; Email: francois.cornet@ibcg.biotoul.fr

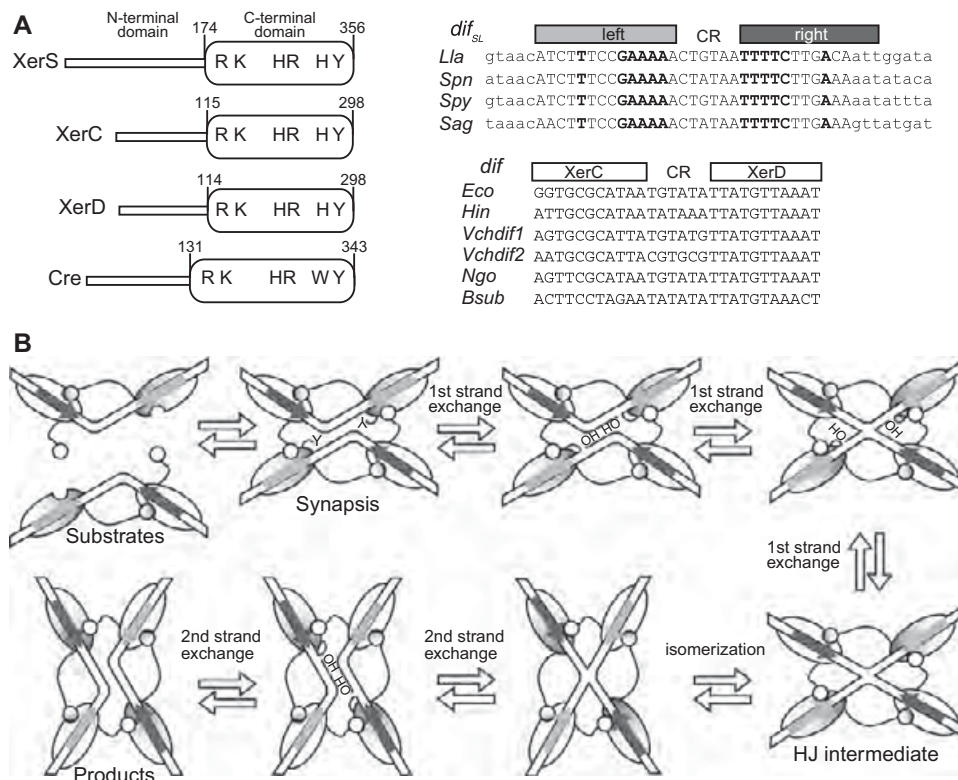


Figure 1. The FtsK-XerCD/*dif* and FtsK-XerS/*dif_{SL}* systems. (A) Left: diagram of the XerC, XerD, XerS and Cre proteins, with their length and domain organization (in amino acid). The conserved residues involved in catalysis are indicated. Right: *dif_{SL}* and *dif* sites of representative bacteria with the recombinase binding sites, separated by the central region (CR) indicated. In *dif_{SL}* sites, upper case bases are part of the previously defined minimal site (28) and bases shown in bold typeface are inverted repeats within this minimal site. The left-half site is indicated by the pale grey bar and the right-half site by the dark grey bar. This convention is used throughout the paper. In *dif* sites, the two half sites recognized by XerC and XerD, respectively, are indicated. *Lla*, *L. lactis*; *Spn*, *Streptococcus pneumoniae*; *Spy*, *S. pyogenes*; *Sag*, *S. agalactiae*; *Eco*, *E. coli*; *Hin*, *H. influenzae*; *Vch*, *V. cholerae*; *Ngo*, *Neisseria gonorrhoeae*; *Bsub*, *B. subtilis*. (B) A diagram of the mechanism of recombination by Y-recombinase based on the data obtained for the Cre/*loxP* system. Y indicates the catalytic tyrosine residue. OH is the 5' hydroxyl group created by DNA cleavages.

initiate recombination by XerC-mediated strand exchange (7). This bias is thought to be due to both the asymmetry of the *dif* sequence and the use of two different recombinases. This “XerC-first” pattern applies to activities of XerCD other than the resolution of chromosome dimers: during the resolution of plasmid multimers at the *psi* or *cer* sites (8) and during the integration of bacteriophage genomes into their host *dif* sites (9). In these cases, HJ resolution by XerD catalysis is either not required (*cer* site and phage integration) or is induced by isomerization of the HJ intermediate (*psi* site, Figure 1B). In chromosomal XerCD/*dif* complexes, recombination is controlled by FtsK, a DNA translocase associated with the cell division septum (3). In the absence of FtsK, XerD has no catalytic activity and HJ-intermediates may be generated by XerC catalysis. However, these intermediates are not fully resolved to generate products, but are instead reconverted into substrates, by further XerC catalysis (7,10). Chromosome dimer resolution requires FtsK, which induces recombination by forcing XerD to catalyse the exchange of the first pair of strands.

FtsK is required for both cell division and faithful chromosome segregation [reviewed in (3)]. Its N-terminal domain is essential for growth and contains

transmembrane helices that target FtsK to the division septum. Its C-terminal domain (FtsK_C), which is dispensable for viability, encodes the translocation motor (7). The α and β subdomains of FtsK_C carry Walker-type ATPase motifs and form a hexameric motor (11). The extreme C-terminal subdomain, FtsK γ , controls FtsK translocation and Xer recombination. FtsK γ contains a DNA-binding motif that binds to specific DNA motifs, the KOPS (5'-GGGNAGGG). KOPSs are preferentially oriented towards the *dif* site, thereby orienting translocation towards *dif* (12–17). Translocation stops when the XerCD/*dif* complex is reached, and this termination of translocation is FtsK γ -independent (18). Recombination is then induced by a mechanism thought to involve a particular interaction of FtsK_C with the DNA in the immediate vicinity of *dif* (19) and a direct interaction between FtsK γ and XerD (20). This second interaction induces XerD-mediated strand exchange *in vitro*, suggesting it induces a recombination pathway in which XerD catalyses the exchange of the first pair of strands, leading to productive recombination and dimer resolution (20).

Homologs of FtsK are found in most bacteria, in which they are involved in DNA transfer during conjugation, sporulation and chromosome segregation (21–25).

Y-recombinases are also widespread and may play a role in various DNA transactions (5,26). Homologs of XerC and XerD, together with a potential *dif* site opposite the origin of replication, are found in most proteobacteria and firmicutes (27–29). Other families of bacteria use alternative systems to resolve chromosome dimers (28,29). In streptococci/lactococci, a family of firmicutes, the dimer resolution system consists of a single Y-recombinase, XerS, which is responsible for recombination at a specific recombination site, *dif_{SL}* (Figure 1A) (28). The XerS/*dif_{SL}* system is the only single-recombinase Xer system functionally studied to date. However, it is certainly not the only such system. It has recently been reported that a subgroup of ϵ -proteobacteria harbour only one conserved Y-recombinase, XerH, together with a potential *dif* site resembling *dif_{SL}* and located within the putative terminus regions of these bacteria (29). In evolutionary terms, XerH is only distantly related to XerCD and XerS, consistent with the acquisition of Xer systems on several occasions during evolution (29).

The *Lactococcus lactis* XerS/*dif_{SL}* system resolves chromosome dimers in an FtsK_C-dependent manner if it is used to replace the XerCD/*dif* system in *E. coli* (28). This observation seems to go against the highly accurate control of chromosome dimer resolution in *E. coli*, which involves specific interactions between partners, and raises questions about the possible control of dimer resolution by a single recombinase. In this study, we investigated the molecular mechanism of XerS/*dif_{SL}* recombination and its control by FtsK. We show that XerS binds and recombinates *dif_{SL}* sites *in vitro*. Both binding and strand exchange were asymmetric. We showed, using *in vivo* assays, that the FtsK-dependent coupling of chromosome segregation with cell division is conserved in the FtsK/Xer system of *L. lactis*. However, the mechanism by which recombination was activated differed from that in the *E. coli* system. FtsK γ can activate XerCD/*dif* recombination on its own, whereas the translocation motor is also required to activate XerS/*dif_{SL}* recombination. These findings have implications for the control of recombination in the two Xer systems.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains and plasmids

Strains used were derived from *E. coli* K12 strain LN2666 [W1485 F- *leu thyA thi deoB* or *C supE rpsL* (StR)], referred as the wt strain (30). Unless indicated, recombinant DNA was constructed in transgenesis vectors of the pFC13 series by standard cloning techniques, and inserted into the chromosome as previously described (30,31). The *dif-lacI-dif* and *dif_{SL}-lacI-dif_{SL}* cassettes were inserted in place of the $\Delta(dif)_{58}$ deletion (30). Three 5'-GGGCAGGG KOPS motifs separated by 6-bp random sequences (5'-TT CATT and 5'-TAGCAT) were eventually inserted in a non-permissive orientation, 10 bp from the XerD binding site of the *dif* site on one side of the *dif-lacI-dif* cassette or at the equivalent position in the *dif_{SL}-lacI-dif_{SL}* cassette. The $\Delta(lacI)$ deletion removes bp –37 to 1075 of the *lacI* gene. In the $\Delta(ftsK_C)::Tc$ allele, the residues from

position 814 to the end of FtsK are deleted. The $\Delta(ftsK\gamma)$ -Cm, *ftsK_{KOPSblind}*-Cm and $\Delta(xerC)::Gm$ alleles have been described elsewhere (32). Resistance gene-tagged alleles were transferred by P1 transduction. For protein production and purification, *xerS* and the *E. coli* and *L. lactis* *ftsK γ* subdomains (corresponding to the sequence from residue 1253 of *E. coli* FtsK and 682 of *L. lactis* FtsK to the ends of these proteins) were inserted into pFSKB3X (GTP Technology, France) to obtain *his-flag-gene* constructs. We then mutated *xerS*, using mutagenic oligonucleotides, to obtain the *xerS^{Y341F}* allele. For *in vivo* expression of the recombinases, genes were inserted into a pGB2 derivative carrying the *araC*-ARAP expression cassette, yielding plasmids pFC241 (pXerC), pCP56 (pXerS) and pFC250 (pXerC-XerD). For FtsK γ and FtsK_C production, the pBAD18 derivatives, pFX150 (pFtsK_C) (7), pCL379 (p- γ *E.coli*) and pCL378 (p- γ *L.lactis*) were used. For subsequent *in vitro* analysis, a synthetic minimal *dif_{SL}* site, 5'ATCTTTCCGAAAAC TGTAATTTTCTTGACA and its variants lacking the right-half site, 5'ATCTTTCCGAAAACGTAAAGGC TACGTCAT, or the left-half site, 5'CTGAGCTAGTCA CACTGTAATTTTCTTGACA, were inserted into pGhost9 (33).

Purification of XerS

For XerS and XerS^{Y341F} purification, pCL255 (XerS) and pCL360 (XerS^{Y341F}) were transferred to *E. coli* strain BL21 (DE3; Novagen). The resulting strains were grown in L broth at 42°C, to an OD₆₀₀ of 0.6. We then added IPTG (0.1 mM) to the medium and incubated the culture at 25°C for 3 h. Cells were recovered by centrifugation, resuspended in buffer [50 mM phosphate buffer pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, 10% glycerol, 1 mg/ml lysozyme, 230 μ g/ml RNaseA and EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche)], sonicated and the lysate was cleared by centrifugation. His-FLAG-tagged XerS and XerS^{Y341F} were purified on nickel resin (1 ml His-trap HP, GE Healthcare) followed by heparin (1 ml High-Trap HP, GE Healthcare) and gel filtration (HiLoad 16/60 Superdex 200, GE Healthcare) columns (Supplementary Figure S1). Purified recombinases were concentrated with an ICON concentrator (Thermoscientific) and stored at –80°C in buffer containing 40 mM Hepes (pH 7.7), 400 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA and 10% glycerol.

In vitro experiments

For electrophoretic mobility shift assays (EMSA), 142-bp fragments carrying the site of recombination at their centre were amplified by PCR and purified by gel electrophoresis. These substrates were 5' end-labelled with [γ -³²P] ATP and T4 DNA polynucleotide kinase. Binding reactions were carried out in a buffer containing 25 mM Hepes (pH 7.7), 50 mM KCl, 0.25 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 10 μ g/ml BSA, 10 mM MgCl₂ and 10% glycerol, in the presence of 10 000 c.p.m. of labelled DNA (<1 nM), 1 μ g of poly(dI-dC) and the indicated protein concentrations. The reactions were incubated at 30°C for 30 min and analysed by electrophoresis in 5% polyacrylamide native

gels run in TGE. Gels were dried and analysed with a Fuji PhosphorImager.

For DNase I footprinting analysis, various amounts of XerS were mixed with 226-bp *dif_{SL}*-carrying DNA fragments labelled with ³²P at the 5' end of either the top or the bottom strand (BS). Reactions were performed as for EMSA. After 30 min of incubation at 30°C, we added 7 mM MgCl₂ and 3 mM CaCl₂, and partial digestion of the DNA was initiated by adding 1 μl of an empirically determined dilution (typically 10⁻³) of a DNase I stock solution. The mixture was incubated for 2 min at 30°C and the reaction was stopped by adding 1 μl EDTA (0.5 M). The DNA was then precipitated in ethanol, re-suspended in 6 μl of loading buffer and separated by electrophoresis in an 8% polyacrylamide denaturing sequencing gel run in TBE. A sequencing reaction was carried out with the Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB) and was run in parallel, as a size marker. Gels were dried and analysed with a PhosphorImager.

For recombination experiments, the HJ substrate (Figure 3) was constructed by annealing four oligonucleotides:

- (I) 5'-CTGCCGTGATCACGCTGAACGCGTTTTAGCATCTTTCCGAAAACTGTAATTTTCTTGACAA TTGGAGGCCTAACGCCTAAAGCGGCCGCTA GTCC;
- (II) 5'-GGACTAGGCGGCCGCTTTAGGCGTTAGGC CTCCAATTGTCAAGAAAATTACAGTTTTTTCGG AAAGATCGACCGTTGCCGGATCCGCTGC;
- (III) 5'-GGATTCGAGATCTCAGGATGTCTCCAATT GTCAAGAAAATTACAGTTTTTTCGGAAAGATG CTAACCGCGTTCAGCGTGATCACGGCAG;
- (IV) 5'-GCAGCGGATCCGGCAACGGTCGATCTTT CCGAAAACTGTAATTTTCTTGACAATTGGAG ACATCCTGAGATCTCGAATCC.

The indicated oligonucleotide (20 pmol) was 5' end-labelled with [γ -³²P] ATP and T4 DNA polynucleotide kinase and was mixed with the other, unlabelled oligonucleotides (30 pmol each). The oligonucleotides were annealed by heating to 100°C and slow cooling. The HJ-containing molecules were purified by PAGE in a 5% polyacrylamide gel, recovered from excised gel slices by incubation in elution buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 0.2% SDS, 0.3 M NaCl, 1 mg/ml glycogen], precipitated in ethanol and re-suspended in deionized water. Reactions were performed as described earlier for EMSA (except that the reaction buffer contained 5 mM spermidine) and were stopped by adding 1% SDS and 1 mM EDTA. The samples were then treated with proteinase K (1 h at 37°C) and the DNA was analysed by PAGE in 5% polyacrylamide native gels in (Tris/glycin/EDTA) TGE or in 8% polyacrylamide denaturing gels (containing 7 M urea) in 8% TBE.

Co-culture experiments

Co-culture experiments were conducted as previously described (34). Briefly, the strains to be analysed were mixed with the parental strains [either wt or Δ (*dif*)::*dif_{SL}* pXerS strains]. In the case of strains containing the

pFtsK_C plasmid, 0.025% arabinose was added during the whole course of the experiment. The mixture of strains was grown in serial cultures, subcultured by dilution every 10 generations and plated every 20 generations on appropriate medium to determine the relative frequencies of the two strains. Frequencies of unresolved dimers were calculated from the slope of strain ratio plotted against generation (34). The means of at least three independent measurements, with SDs, are presented.

XerCD/*dif* and XerS/*dif_{SL}* *in vivo* recombination assay

Strains carrying the Δ (*lacI*) and *xerC*::Gm mutations, either the *dif-lacI-dif* or the *dif_{SL}-lacI-dif_{SL}* cassette in place of the *dif* site and the indicated *ftsK* alleles and plasmids were grown in L broth, rendered competent and transformed with pXerC or pXerS. Transformants were plated on L agar containing 20 μg/ml spectinomycin and grown overnight at 37°C. Five independent transformants were re-suspended in L broth plus spectinomycin and, in some cases, arabinose (0.025% for FtsK_C production and 0.1% for FtsK_γ production), grown 5 h, diluted and plated on L broth plus X-gal (40 μg/ml). This entire procedure corresponds to ~20 generations before plating on L agar plus Xgal. The ratio of dark blue to total colonies was used to calculate the frequency of *lacI* loss per cell, per generation. The mean and SD of five independent measurements are shown in the figures.

Western-blot analysis

Strains were grown in the assay conditions, harvested at an OD₆₀₀ of 0.1 and resuspended in sample buffer (1% SDS, 10% glycerol, 0.1 M DTT, 0.2% bromophenol blue, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8). Samples were boiled for 5 min. We used ~0.04 OD units for each sample. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-C Extra, GE Healthcare). Membranes were then incubated with mouse anti-FLAG primary antibodies (Sigma), followed by goat anti-mouse IgG peroxidase-linked secondary antibodies (Sigma), as indicated by manufacturer, and antibody binding was detected with an ECL kit (Thermo Scientific) and a BioImager (LAS-4000 FUJIFILM).

RESULTS

Asymmetric binding of XerS to *dif_{SL}*

The potential *dif_{SL}* site has been defined as a minimal 31-bp site, on the basis of comparative genomics studies of streptococci and *in vivo* functional assays of recombination activity (Figure 1A) (28). This site contains two imperfect inversely repeated sequences of different sizes that are potential binding sites for XerS (the right and left-half sites in Figure 1), separated by a CR. For studies of XerS binding to *dif_{SL}*, we constructed a *his-flag-xerS* allele. We produced the protein encoded by this allele (herein referred to as XerS), purified it (Experimental procedures section, Supplementary Figure S1) and used it in EMSA experiments with various *dif_{SL}*-containing DNA fragments. We found that the previously defined minimal

dif_{SL} site bound XerS poorly, with efficient binding requiring additional nucleotides flanking the right arm (data not shown). Nucleotides other than those naturally flanking *dif_{SL}* could give efficient binding, demonstrating that these nucleotides are not specific, accounting for their lack of conservation among *dif_{SL}* sites from different streptococci [Figure 1A; (28)].

At low-XerS concentration, a first XerS/*dif_{SL}* complex (C1) is detected, which is transformed into a second lower mobility complex (C2) with increasing XerS concentration (Figure 2A). Considered together with data from other Y recombinase systems, these data suggest that the C1 complex consists of a single XerS monomer bound to one half site of *dif_{SL}*, with the binding of a second monomer to the second half site giving rise to the C2 complex. We then studied the location of XerS binding in DNaseI footprinting experiments (Figure 2B and Supplementary Figure S2). In these experiments, XerS protected both inverted repeats, together with the CR and few base pairs adjacent to the right arm. Thus, the non-specific base pairs next to the right-half site required for efficient binding are also protected from DNaseI cleavage. XerS binding also increased sensitivity to DNaseI cleavage on either side of *dif_{SL}*, suggesting that the DNA is distorted at these positions, which thus probably correspond to the first unbound bases on either side of the XerS/*dif_{SL}* complex (Figure 2B and Supplementary Figure S2). Thus, the *dif_{SL}* site is longer than previously thought and the left and right XerS binding sites are of similar lengths.

The left and right-half sites of *dif_{SL}* are not perfect inverted repeats (Figure 1A). We therefore studied XerS binding to the two half sites separately. We did this by using *dif_{SL}* variants in which one of the half sites had been mutated. Both half sites formed a complex equivalent to the C1 complex (Figure 2C and D) in these experiments, consistent with our hypothesis that this complex consists of a single XerS monomer bound to one half site. XerS bound the left arm with a much higher affinity than the right arm (compare Figure 2C and D). This suggests that XerS binds preferentially to the left arm and co-operatively to the right arm of *dif_{SL}*. At high-XerS concentration, a second complex is detected with DNA carrying the low affinity right-half site (C3 in Figure 2D). XerS binding to the right-half site may thus promote the binding of a second XerS monomer to non-specific adjacent sequences. However, this complex appeared to be different from the C2 complex, indicating that the left arm DNA is required for the formation of a C2 complex in the correct conformation.

Strand preference in XerS/*dif_{SL}* recombination

As XerS belongs to the Y-recombinase family, the recombination it mediates should involve a HJ-containing intermediate, produced by the exchange of a first pair of strands by a pair of recombinases and with product resolution subsequently achieved by the exchange of the second pair of strands by the other pair of recombinases [reviewed in (5); Figure 1B]. The catalytic state of pairs of recombinases thus switches from active to inactive and

vice versa, during the HJ step of the reaction, making this intermediate a target of choice for control of the reaction. This led us to assay XerS-mediated cleavage and strand exchange with HJ-containing substrates. We constructed a HJ-containing substrate that mimicked classical intermediates of Y recombinase-driven recombination (35–37) (Figure 3A). The incubation of this HJ substrate with XerS yielded linear products of the expected size following cleavage by both pairs of recombinases (B1 and T1 in Figure 3B). Thus, XerS is able to cleave both the *dif_{SL}* strands. Covalent complexes between XerS and the DNA were detected in the absence of proteinase K treatment (Supplementary Figure S3). These complexes are intermediate between the cleavage and the ligation steps during strand exchange (Figure 1B). The small quantity of these covalent complexes suggested that religation occurs efficiently to give rise to exchanged strands. We assessed strand transfer directly, by analysing HJ substrates by electrophoresis in denaturing gels after incubation with XerS (Figure 3C and Supplementary Figure S3). The predicted recombinant strands were readily detected in these experiments, showing that XerS does indeed transfer and religate DNA strands. The two pairs of strands are not exchanged equally efficiently, with the BSs clearly being exchanged preferentially (Figure 3B). The two pairs of recombinases therefore do not have equivalent activities at this step in the recombination reaction, demonstrating a marked asymmetry of cleavage-competent XerS/*dif_{SL}* complexes.

Alignment of the amino acid sequence of XerS with those of other known Y recombinases led to the identification of conserved residues involved in catalysis, including Y341, which was identified as the residue likely to be responsible for DNA cleavage (Supplementary Figure S4A). We used mutagenesis to replace this residue by a phenylalanine residue ('Experimental procedures' section). The resulting protein was purified and its *dif_{SL}* binding and cleavage were assessed. XerS^{Y341F} bound *dif_{SL}*, albeit slightly less efficiently than wild type (wt) XerS (Supplementary Figure S4B). As predicted, XerS^{Y341F} was unable to cleave the HJ-containing substrate (Figure 3B), demonstrating the involvement of Y341 in catalysis.

Taken together, these results show that XerS binds *dif_{SL}* and exchanges its DNA strands *in vitro*. Both activities were found to be highly asymmetric: binding to the left-half site was more efficient than binding to the right-half site and a preferential exchange of the BSs was observed. As other known bacterial Y recombinases cleave DNA *in cis* (Figure 1B) (5), we would expect the BSs of *dif_{SL}* to be cleaved by recombinases bound to its right-half site, which interacts poorly with XerS.

Translocation by septum-borne FtsK controls dimer resolution by XerS/*dif_{SL}*

We studied the control of chromosome dimer resolution by XerS/*dif_{SL}*, using *E. coli* strains harbouring *dif_{SL}* in place of the *dif* site and measuring the capacity of these strains to resolve dimers, by co-culture with a parental reference strain ['Experimental procedures' section; (34)].

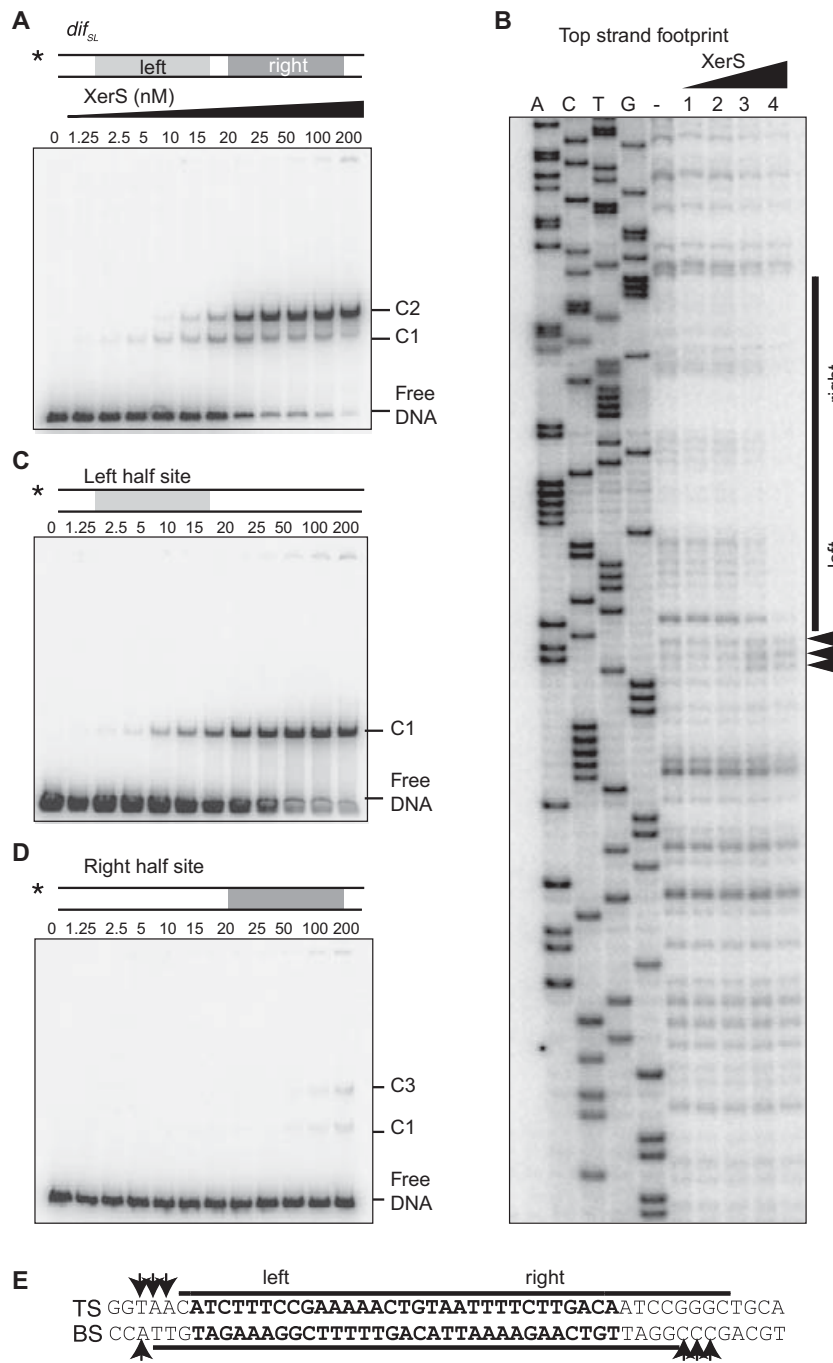


Figure 2. Asymmetric binding of XerS to *dif_{SL}*. (A) Titration of a 142-bp DNA fragment containing *dif_{SL}* by increasing concentrations of XerS in an EMSA experiment. The DNA substrate is shown at the top. XerS concentrations are given in nano molar and the positions of the free DNA probes and the C1, and C2 XerS/DNA complexes are indicated. The asterisk indicates the 5'-labelled strand. (B) DNaseI footprinting of the top strand (TS) of *dif_{SL}*. Experiments were carried out with increasing XerS concentrations, as described in the 'Experimental procedures' section. A, C, T and G, ladder sequence of the *dif_{SL}*-containing substrate; (-) lane, no XerS; Lanes 1, 2, 3 and 4: reactions contained 12.5, 25, 50 and 100 nM XerS, respectively. The region protected from cleavage is indicated by the black bars and positions of increased cleavage by arrows. (C and D) Same experiments as in (A), with substrates containing mutated right- and left-half sites, respectively. (E) Summary of the data for the *dif_{SL}* sequence. The footprint of the BS is shown in Supplementary Figure S2. Black bars, protected regions; Arrows, positions hypersensitive to cleavage.

The $\Delta(dif)::dif_{SL}$ strain producing XerS from a plasmid (pXerS) displayed a clear growth advantage over the *dif⁺ Δ(xerC)* strain, which is unable to resolve dimers (Figure 4B and C). On the other hand, this strain

displayed no viability difference with the wt strain, which resolves dimers by XerCD/*dif* recombination (Figure 4B and C). Thus XerS/*dif_{SL}* is as efficient as XerCD/*dif* for the resolution of chromosome dimers in

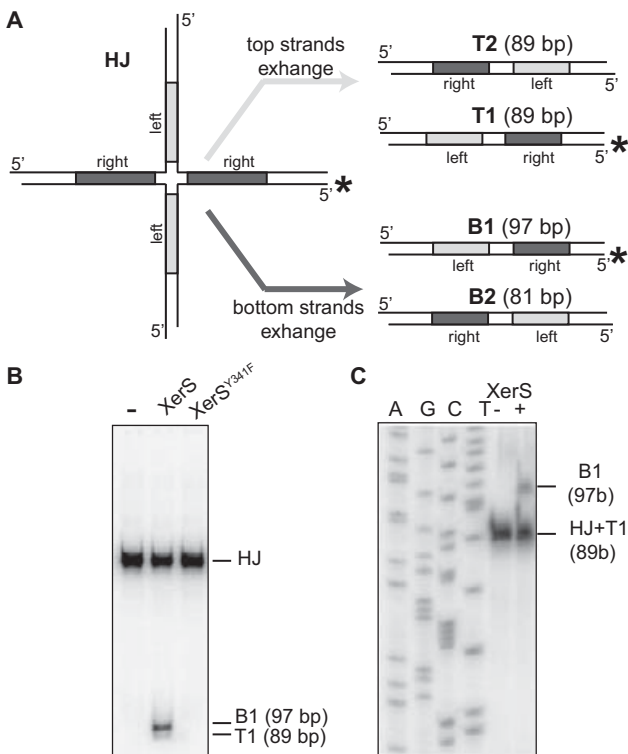


Figure 3. Strand exchange by XerS. (A) Left: diagram of the HJ substrate with the labelled strand indicated by asterisk. The left and right *dif_{SL}* half sites are indicated by pale grey and dark grey, respectively. Right: resolution products (T1, T2 and B1, B2; with their respective sizes indicated) obtained by exchange of either the top or bottom pairs of strands (defined in Figure 2). Labelled strands are indicated by asterisk. (B) PAGE analysis of the recombination products with positions of the substrate (HJ), B1 and T1 products indicated. (-) lane, no XerS; XerS and XerS^{Y341F} lanes, reactions contained 200 mM of the protein indicated. (C) Analysis of the individual DNA strands by denaturing PAGE. Positions of the labelled strands are indicated. (AGCT) lanes, size ladder ('Experimental procedures' section). (-) lane, no XerS; (+) lane: reaction contained 200 nM XerS.

E. coli. Mutant alleles of *ftsK* (Figure 4A) were then transferred to the $\Delta(dif)::dif_{SL}$ pXerS strain. The deletion of FtsK_C or the mutation of its ATP hydrolysis motif both inactivate dimer resolution in *E. coli* (38,39). These mutations also inactivated dimer resolution by the XerS/*dif_{SL}* system, demonstrating a dependence of the dimer resolution activity of XerS/*dif_{SL}* on FtsK_C and its translocation activity. We then produced the C-terminal domain of FtsK from a plasmid in $\Delta(ftsK_C)$ strains, in expression conditions that support XerCD/*dif* recombination (see below and 'Experimental procedures' section). This form of FtsK that lacks the N-terminal domain and is thus not bound to the division septum does not support dimers resolution by the XerCD/*dif* system (10,40). Although coculture experiments with strains containing pFtsK_C showed important variations and high standard deviations (SD), it was clear that FtsK_C did not support significant rates of dimer resolution (Figure 4B). Thus, dimer resolution by the XerS/*dif_{SL}* systems requires a septum-borne FtsK.

We assayed recombination directly, by constructing strains carrying two directly repeated *dif_{SL}* sites flanking the *lacI* gene (Figure 5A; 'Experimental procedures' section). This *dif_{SL}-lacI-dif_{SL}* cassette was inserted in place of the *dif* site, in a strain carrying a deletion of *lacI*. This made possible the accurate assessment of recombination events, evaluated by scoring the number of blue colonies after transformation with pXerS. As previously reported, XerS/*dif_{SL}* recombined at high frequency (~12% per generation) when inserted at the *dif* position, and recombination was found to be dependent on FtsK_C (Figure 5B) (28). As previously shown for XerCD/*dif* (10), inactivation of the ATPase activity of FtsK inactivated XerS/*dif_{SL}* recombination, showing that FtsK translocation is a prerequisite for the activation of XerS/*dif_{SL}* recombination. The production of FtsK_C in the $\Delta(ftsK_C)$ strains significantly increased the frequency of XerS/*dif_{SL}* recombination (Figure 5B). Thus, septum-independent FtsK_C is sufficient to induce XerS/*dif_{SL}* recombination, but only septum-tethered FtsK_C can induce chromosome dimer resolution.

FtsK γ activates XerS/*dif_{SL}* recombination via a local effect

The data reported above suggest that recombination is controlled in similar ways in the *L. lactis* and *E. coli* Xer systems: both the XerS/*dif_{SL}* and XerCD/*dif* systems resolve chromosome dimers in an FtsK_C-dependent manner and, in both cases, recombination can be induced by septum-independent FtsK_C, but dimer resolution can only occur if FtsK_C is tethered to the septum [Figures 4 and 5; (10,38,40,41)]. This suggests that the *L. lactis* FtsK homologue, FtsK_{LI}, exerts the same regulatory activity as the *E. coli* FtsK. We therefore replaced the C-terminal domain of *E. coli* FtsK by its homologue in FtsK_{LI} ('Experimental Procedures' section) and measured its capacity to induce XerS/*dif_{SL}* and XerCD/*dif* recombination. We used strains carrying equivalent *dif_{SL}-lacI-dif_{SL}* or *dif-lacI-dif* cassettes and producing the cognate recombinase from plasmids ('Experimental procedures' section). The resulting *ftsK_{CLI}* chimera supported high frequencies of recombination by both the XerS/*dif_{SL}* and XerCD/*dif* systems (Figure 6B). Thus, either the activities of FtsK_C are conserved between these two bacteria or some of these activities are dispensable for normal levels of recombination.

In *E. coli*, the FtsK γ subdomain is responsible for the recognition of both KOPS and XerD. The level of identity of the *E. coli* and *L. lactis* FtsK γ subdomains (41% over 61 residues; Figure 6A) suggests that these activities may be conserved in FtsK_{LI}. However, the presence of several changes in important residues is not consistent with this hypothesis. The TEKRKA motif of FtsK, which appears to interact with XerD (20,39,42), is only weakly conserved, and changes in the H2 and H3 helices of the W-helix motif may have made it possible for FtsK_{LI} to recognize DNA motifs other than the *E. coli* KOPS motif (Figure 6A). We compared the roles of FtsK γ activities in XerS/*dif_{SL}* and XerCD/*dif* recombination, by first using a $\Delta(ftsK\gamma)$ allele. As previously reported for the XerCD/*dif* system (32), the

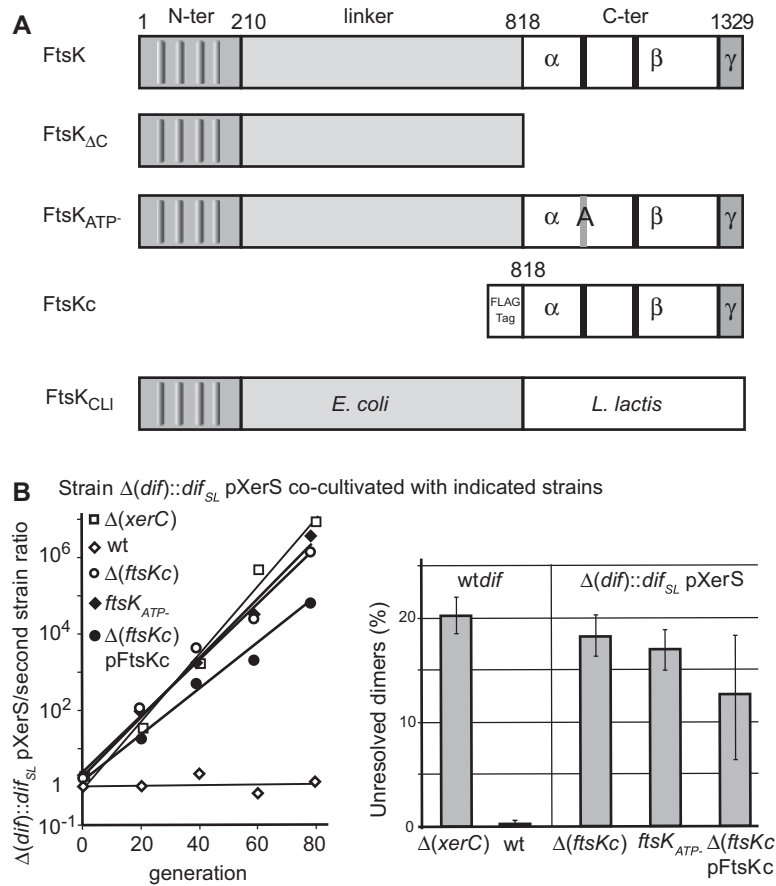


Figure 4. Resolution of chromosome dimers by XerS/*dif_{SL}*. (A) Diagram of the FtsK mutants used. Top line, wt *E. coli* FtsK with the three domains and the C-terminal subdomains indicated (α, β, γ). Black bars represent the A and B Walker-type motifs. Co-ordinates at the top are in amino acid. The grey bar labelled (A) indicates the mutation of the FtsK_{ATP-} mutant. The FtsK_C domain was produced from a plasmid (pFtsK_C; ‘Experimental procedures’ section) under the control of the pBAD promoter and was used in $\Delta(ftsK_C)$ strains in the presence of 0.025% arabinose. (B) Left: typical co-culture experiments. A $\Delta(dif)::dif_{SL}$ strain carrying the pXerS plasmid was co-cultured with strains carrying either the *dif* site [$\Delta(xerC)$ and wt strains] or the *dif_{SL}* site in place of *dif*, the pXerS plasmid and the indicated *ftsK* allele [$\Delta(ftsK_C)$, *ftsK_{ATP-}* and $\Delta(ftsK_C)$ pFtsK_C strains]. Right: frequencies of unresolved dimers in the indicated strains, calculated from experiments in B (34). The mean results of at least three independent experiments with standard deviations are shown.

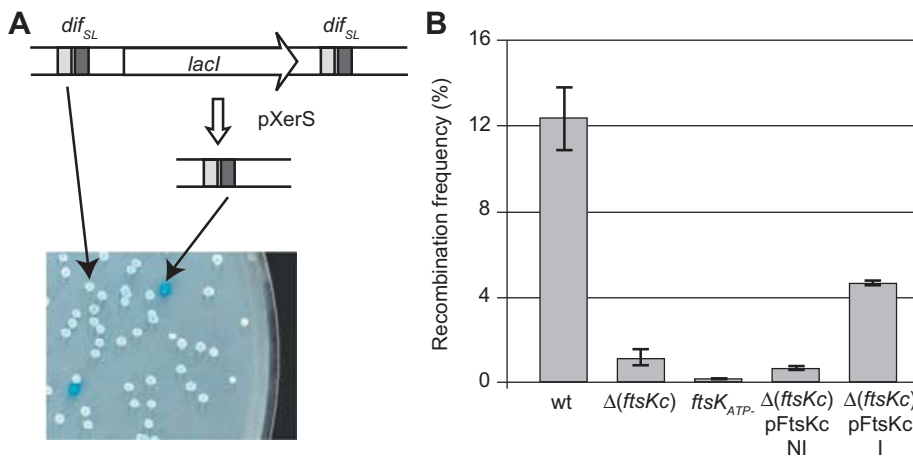


Figure 5. XerS/*dif_{SL}* recombination depends on the translocation activity of FtsK_C. (A) The recombination reporter cassettes used consist of two directly repeated *dif_{SL}*, separated by the *lacI* gene, inserted at the natural position of *dif*. Recombination deletes *lacI*, giving rise to blue colonies on indicator medium. An example of assessments made by plating is shown. (B) Recombination frequencies in strains carrying the *dif_{SL}-lacI-dif_{SL}* cassette and the indicated *ftsK* alleles (‘Experimental procedures’ section). Proteins encoded by the $\Delta(ftsK_C)$ and *ftsK_{ATP-}* mutations and the pFtsK_C plasmid are shown in Figure 4A. Strains containing pFtsK_C were grown in absence of inducer (NI) or in presence (I) of 0.025% arabinose.

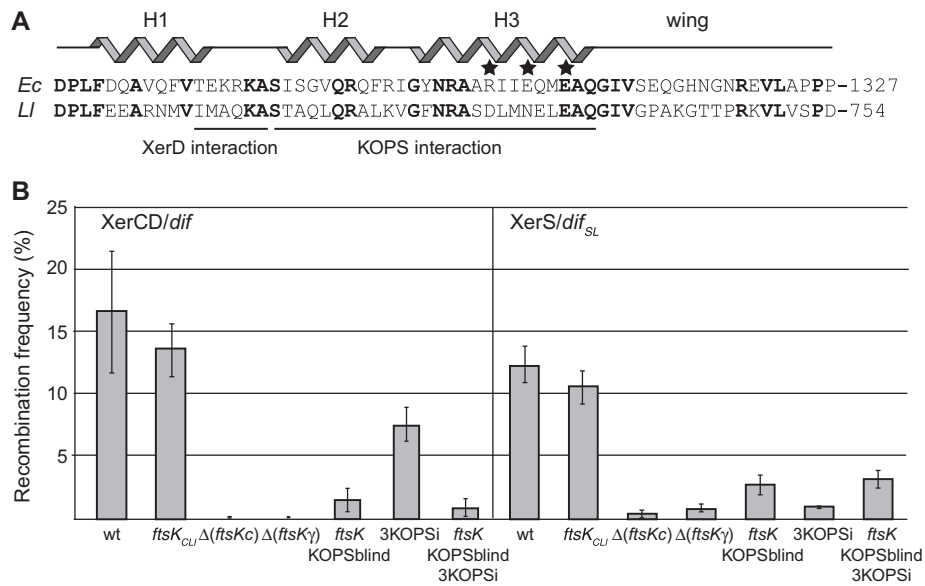


Figure 6. FtsK must reach *dif_{SL}* to induce recombination. (A) Alignment of the FtsK γ subdomains of *E. coli* (*Ec*) and *L. lactis* (*Ll*). Structural features of the *Ec* FtsK γ are indicated: the H1-3 helices and the wing of the w-helix DNA-binding domain. Identical residues are shown in bold and residues for which mutation leads to the KOPS-blind phenotype are indicated by stars. The regions thought to interact with XerD and the KOPS motif are indicated. The co-ordinate of the last residue aligned here is given to the right. (B) Recombination frequencies in strain carrying either a *dif-lacI-dif* (left, XerCD/*dif*) or a *dif_{SL}-lacI-dif_{SL}* (right, XerS/*dif_{SL}*) recombination cassette, the pXerC or pXerS plasmids, respectively, and the indicated *ftsK* alleles and/or insertion of non-permissive KOPS motifs close to one of the recombination sites (3KOPSi; 'Experimental procedures' section). The Δ (*ftsK_C*):*ftsK_{CLl}* allele carries the whole C-terminal domain of *L. lactis* FtsK in place of the *E. coli* domain ('Experimental procedures' section; Figure 4A). The *ftsK_{KOPSBblind}* allele carries mutations of the three residues indicated by stars in (A).

deletion of FtsK γ had the same effect on XerS/*dif_{SL}* recombination as deletion of the entire FtsK_C (Figure 6B). Thus, the translocation activity of FtsK is not sufficient to induce XerS/*dif_{SL}* recombination, with at least one of the FtsK γ activities being required. We then inactivated the KOPS recognition activity of FtsK, using the *ftsK_{KOPSBblind}* allele (Figure 6A) (16,32). This almost completely inactivated XerS/*dif_{SL}* recombination, demonstrating a requirement for FtsK to translocate to *dif_{SL}* to activate recombination. It follows that, as the FtsK_{CLl} chimera supports recombination, FtsK_{LI} either recognizes the *E. coli* KOPSs or a motif with an orientation sufficiently biased in the *ter* region of the *E. coli* chromosome to direct translocation towards the *dif* site. We investigated whether FtsK needed to reach the XerS/*dif_{SL}* complex to induce recombination, by inserting three KOPS motifs (5'-GGGCAGGG motifs separated by 6-bp random sequences; 'Experimental procedures' section), 10 bp from the recombination cassettes in a non-permissive orientation, thereby preventing FtsK from reaching one side of the cassette (12). This significantly reduced XerS/*dif_{SL}* recombination in *ftsK_{wt}* conditions but had no effect in *ftsK_{KOPSBblind}* conditions (Figure 6B). The same effects were observed in equivalent strains carrying the *dif-lacI-dif* cassette (Figure 6B). We conclude that FtsK must reach the XerS/*dif_{SL}* complex for the induction of XerS/*dif_{SL}* recombination.

A differential role for FtsK γ

The data presented above and previous reports suggest that FtsK must deliver FtsK γ to the recombination

complex to induce recombination through a direct interaction with the recombinases. However, for XerS/*dif_{SL}*, this appears to be inconsistent with the poor conservation of the TEKRKA motif in FtsK_{LI} (Figure 6A). Furthermore, the XerD residues identified as potentially interacting with FtsK γ are not conserved in XerS (Figure 7A). To investigate the mechanisms underlying the activation of recombination, we first attempted to set up *in vitro* recombination using purified FtsK_{50C} (7) and XerS proteins. We repeatedly failed to observe XerS/*dif_{SL}* recombination in conditions supporting XerCD/*dif* recombination (data not shown), which further suggested a difference in the mechanism of XerCD/*dif* and XerS/*dif_{SL}* recombination induction. We then assayed the FtsK γ -mediated activation of recombination *in vivo*. To this aim, we assessed the effect of *ftsK γ* expression in strains with deletions of either *ftsK_C* or *ftsK γ* carrying the recombination cassettes. Control experiments in these mutant strains showed that XerS supported higher levels of FtsK_C- and FtsK γ -independent recombination than XerCD (1 and 0.01%, respectively; Figure 7B). The *E. coli* and *L. lactis* FtsK γ genes were cloned and fused to a FLAG tag for subsequent western analysis and plasmids producing one or other of these FtsK γ proteins were introduced into the Δ (*ftsK γ*) and Δ (*ftsK_C*) strains. Western analysis showed that *E. coli* FtsK γ and *L. lactis* FtsK γ were produced to similar levels in the assay conditions used (Figure 7B; 'Experimental procedures' section).

Escherichia coli FtsK γ supported recombination by the *E. coli* XerCD/*dif* system in both Δ (*ftsK_C*) and Δ (*ftsK γ*)

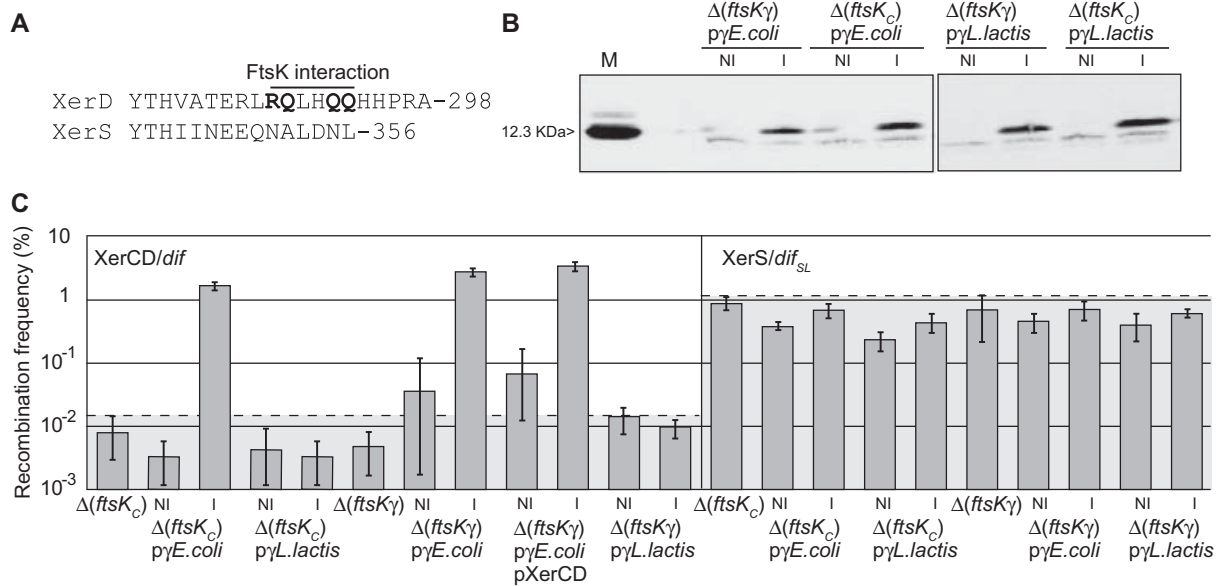


Figure 7. FtsK γ induces XerCD/*dif* but not XerS/*dif_{SL}* recombination. (A) Alignment of the FtsK interaction region of XerD with its corresponding region in XerS. Residues inferred to interact with FtsK are indicated and shown in bold typeface [R1300A, E1303A, E1306A; (21)]. The co-ordinate of the last residue is given to the right. (B) Western-blot analysis of FtsK γ production. Cells were collected from the indicated strains during the course of the experiments shown in (C). His-Flag-tagged *E. coli* and *L. lactis* FtsK γ were detected with an anti-FLAG antibody ('Experimental procedures' section). M, Purified *E. coli* His-FLAG-FtsK γ , with its size indicated. The faint bands that migrate faster than the FtsK γ peptides are background detection in the migration front of the gel. (C) Recombination frequencies in strains carrying either a *dif-lacI-dif* (left, XerCD/*dif*) or a *dif_{SL}-lacI-dif_{SL}* (right, XerS/*dif_{SL}*) recombination cassette and the indicated *ftsK* alleles and FtsK γ -coding plasmid. Recombination was induced by transformation with the pXerC plasmid (all strains in the XerCD/*dif* panel except strains labelled pXerCD for which the pXerC-XerD plasmid was used; 'Experimental procedures' section), or the pXerS plasmids (XerS/*dif_{SL}* panel). NI, absence of inducer; I, FtsK γ production was induced by adding 0.1% arabinose. The dotted lines and grey zones indicate the FtsK $_C$ -independent recombination background for the two systems. In both cases, the recombination background in the absence of the cognate recombinase is below 10^{-3} (data not shown).

strains (Figure 7C). Thus, the translocation activity of FtsK is not required for the induction of recombination and it is not essential for FtsK γ to be tethered to FtsK $_C$ for the induction of recombination. In contrast, *E. coli* FtsK γ did not support recombination by the XerS/*dif_{SL}* system (Figure 7C). The *L. lactis* FtsK γ did not support recombination by either of the Xer systems (Figure 7C). In these experiments, XerS is produced from a plasmid, while XerCD/*dif* recombination is analysed in strains containing normal levels of XerD, making it possible that the difference observed between the two Xer systems is due to a titration of FtsK γ by excess XerS ('Experimental procedures' section). We ruled out this possibility by co-producing XerD and XerC from the same plasmid and in the same conditions as XerC or XerS alone ('Experimental procedures' section). This yielded equivalent levels of FtsK γ -induced XerCD/*dif* recombination as production of XerC alone (Figure 7B), showing that FtsK γ titration by excess recombinase does not explain the observed effects. Taken together, these data strongly suggest that there is no FtsK γ -XerS interaction functionally equivalent to the FtsK γ -XerD interaction in the *L. lactis* FtsK-XerS system.

DISCUSSION

We have shown in this study that the control of chromosome dimer resolution and its coupling with cell division are mostly conserved between evolutionary remote

FtsK-Xer systems involving either one or two recombinases. Indeed, despite this important difference, the *E. coli* XerCD/*dif* and the *L. lactis* XerS/*dif_{SL}* systems have several important characteristics in common, in terms of their recombination mechanism and its control by the FtsK translocase. The mode of binding of XerS to *dif_{SL}* is similar to the mode of binding of XerCD to *dif*. Both recombinase/DNA complexes are highly asymmetric, with one of the two half sites bound with higher affinity [Figure 2; (43)]. Similarly, cleavage and strand exchange are also asymmetric in these two systems. XerS preferentially exchanged the BSs of *dif_{SL}* on HJ-substrates, which, assuming XerS cleaves DNA in *cis*, would be cleaved by the monomer bound with weaker affinity to the right-half site (Figure 3). Similarly, XerC displays less efficient binding but more efficient strand exchange than XerD, with *dif*-containing HJ substrates (35,44). The control of recombination by FtsK is also similar in the two systems. Both Xer systems require FtsK $_C$ translocation activity for efficient recombination, and a physical tethering of FtsK $_C$ to the division septum for the resolution of chromosome dimers [Figures 4 and 5; (10,38,41)]. The XerCD/*dif* system also appears to be faithfully controlled by the *L. lactis* FtsK $_C$ and the XerS/*dif_{SL}* system is controlled by *E. coli* FtsK in assays *in vivo* in *E. coli* [Figure 6; (28)]. These results unambiguously show that the mode of chromosome dimer resolution and its coupling with cell division by FtsK described in *E. coli* can operate in Xer systems including only one recombinase. We therefore

cannot account for the selection of two-recombinase systems in most bacteria due to a need for two enzymes for the control of recombination. Importantly, these controls also apply to non rod-shaped bacteria from phyla other than Proteobacteria. These findings conflict with those obtained for *Bacillus subtilis*, which, like *L. lactis*, belongs to the Firmicute phylum. *Bacillus subtilis* encodes a 'classical' XerCD/*dif* chromosome resolution system, the activity of which has been reported to be independent of both the FtsK homologues present in this bacterium, SpoIIIE and SftA (formerly YtpT) (45). However, it has recently been reported that the inactivation of SftA results in a high frequency of septum closure over the nucleoids and that this effect depends on RecA (24). This suggests that SftA may control chromosome dimer resolution in *B. subtilis*, although it may not directly control XerCD/*dif* recombination.

A key conserved feature of the XerCD/*dif* and XerS/*dif_{SL}* systems is that efficient recombination, in addition to efficient dimer resolution, requires an activation step dependent on FtsK_C. Efficient XerCD/*dif* recombination has been shown to occur at a time corresponding to septation—long after the replication of *dif*—and to depend on the activities of FtsZ and FtsI (46,47). Thus, the observed dependence on FtsK_C certainly ensures that recombination occurs only at the very end of the segregation process, when FtsK reaches the zone of converging KOPS containing the *dif* site, thereby preventing undesirable recombination events creating dimers from monomers or producing other harmful rearrangements. This notion is supported by the data obtained with strains in which chromosome dimers are resolved by the Cre/*loxP* system (48). In such strains, recombination between *loxP* sites inserted in place of *dif* does not depend on FtsK, but the resolution of dimers requires FtsK_C activity (38). The inactivation of FtsK_C leads to a viability defect significantly greater than that observed in strains carrying the XerCD/*dif* or XerS/*dif_{SL}* system [(32), compare with Figure 4B]. This strongly suggests that Cre/*loxP* recombination readily creates dimers in the absence of FtsK_C activity. We thus assume that dependence on FtsK_C prevents harmful recombination events, including dimer formation.

The requirement for an activation step in XerCD/*dif* and XerS/*dif_{SL}* recombination indicates that the recombination synaptic complexes do not assemble efficiently in the absence of FtsK_C or that they do not give rise to productive recombination. A feature clearly linked to this control is the asymmetry of the recombination complexes. In Y-recombinase systems, asymmetry is required for the correct assembly of the synaptic complexes [reviewed in (5)]. The use of two different recombinases in the XerCD/*dif* system clearly adds an additional level of asymmetry. This certainly contributes to the weak activity of the XerCD/*dif* complex in the absence of FtsK_C (Figure 7). In this view, the conformation that activates XerD catalysis is highly improbable at both the synapsis and HJ intermediate steps, so productive recombination occurs only when imposed by FtsK. A similar control mechanism seems to operate in the XerS/*dif_{SL}* system, although may be less stringent, hence the higher

recombination activity in the absence of FtsK_C of the XerS/*dif_{SL}* compared to the XerCD/*dif* system. Notably, this difference is not due to different levels of recombinase production (Figure 7C). Thus, the use of two recombinases, incorporating an additional level of asymmetry, may allow tighter control of recombination than is possible with a single recombinase. The control exerted over recombination events may also involve a differential control of individual strand exchanges. In the XerCD/*dif* system, the exchange of a first pair of strands can occur in the absence of FtsK_C, producing the HJ intermediate *in vitro* and *in vivo* (10). It may be essential to keep XerCD/*dif* complexes active for XerC-mediated strand exchange, for the integration of foreign DNA by XerCD recombination. This is the case during integration of the *Vibrio cholerae* CTX prophage, in which XerC catalyses the formation of an integration intermediate that is not further processed by XerD-mediated catalysis (9). This mechanism may be general to proteobacteria, in which an increasing number of mobile elements have been shown to integrate into the host *dif* site (49–51). Tight control of the exchange of the two pairs of strands may not be possible in single-recombinase Xer systems. Two recombinase systems may therefore have been selected due to their role in horizontal gene transfer. Consistent with this idea, no mobile genetic element integrated into the streptococcal or lactococcal *dif_{SL}* sites has been reported to date.

The mechanism by which FtsK activates recombination remains unclear. Our data show that FtsK_γ is sufficient to induce XerCD/*dif* recombination independently of FtsK_C (Figure 7). In these conditions, FtsK_γ interacts with XerD and induces the XerD-mediated exchange of either the first or the second pair of strands. Whatever the mechanism involved in these recombination events, it contrasts with the lack of recombination observed with the *ftsK_{ATP}* allele (39), which encodes an intact FtsK_γ subdomain and may thus induce recombination in the absence of translocation. In addition, an FtsK_{CATP} mutant protein produced in conditions equivalent to those used here for FtsK_γ production did not induce XerCD/*dif* recombination (10). These data suggest that, when tethered to FtsK_{αβ}, FtsK_γ cannot induce recombination in the absence of translocation. FtsK_γ may thus be inactivated by an interaction with FtsK_{αβ}, which is released during translocation, or when FtsK reaches the XerCD/*dif* complex. *Lactococcus lactis* FtsK_γ cannot induce recombination by itself, even through the XerS/*dif_{SL}* system. There is therefore no interaction equivalent to the *E. coli* FtsK_γ-XerD interaction in the *L. lactis* system (Figure 7). Nevertheless, the FtsK_{CLI} chimera induces high levels of recombination by both systems, strongly suggesting that the specific FtsK_γ-XerD interaction is also dispensable for the induction of XerCD/*dif* recombination (Figure 6). This finding contrasts with a previous report that an FtsK chimera carrying the C-terminal domain of *Haemophilus influenzae* FtsK is deficient in XerD activation, resulting in a large deficit in XerCD/*dif* recombination in *E. coli* (39). However, further analysis of this FtsK allele suggests that this chimeric protein is also deficient for the recognition of

KOPS motifs, which certainly accounts for the recombination deficiency observed in strains carrying this chimera (C. Pages and F. Cornet, unpublished data).

So, what is the likely mechanism for recombination induction common to *E. coli* and *L. lactis*? The observation that the insertion of non-permissive KOPS motifs next to a *dif_{SL}* site strongly inhibits XerS/*dif_{SL}* recombination strongly suggests that FtsK must come into close contact with the XerS/*dif_{SL}* complex to activate recombination (Figure 6). We thus hypothesize that recombination induction involves a special activity of the FtsK $\alpha\beta$ translocation motor on reaching the recombination complex (18). FtsK stops translocating at this point. This cessation of translocation is not dependent on FtsK γ and is not highly sequence-specific, since translocation also stops with Cre/*loxP* and XerCD/*dif* complexes (18). It is accompanied by a particular interaction with bases immediately flanking the *dif* site and, thus, also those flanking the *dif_{SL}* site (19). This suggests a special action of FtsK on the DNA at this step, which may be the major factor indicating an active conformation to the XerCD/*dif* or XerS/*dif_{SL}* complexes. The specific interaction of FtsK γ with XerD would then be an additional but dispensable control, potentially helping to stabilize the active conformation and/or inducing XerD catalysis.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Jean-Yves Bouet for technical assistance and critical reading of the article and the members of the Cornet and Ritzenthaler groups for assistance and helpful discussions.

FUNDING

Cnetre National de la Recherche Scientifique; University Paul Sabatier; Fondation pour la Recherche Medicale (FRM, to S.N.); Agence Nationale de la Recherche (ANR; contract BLAN06-2 134012). Funding for open access charge: ANR (contract BLAN06-2 134012).

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Lesterlin, C., Barre, F. and Cornet, F. (2004) Genetic recombination and the cell cycle: what we have learned from chromosome dimers. *Mol. Microbiol.*, **54**, 1151–1160.
- Sherratt, D. (2003) Bacterial chromosome dynamics. *Science*, **301**, 780–785.
- Bigot, S., Sivanathan, V., Possoz, C., Barre, F. and Cornet, F. (2007) FtsK, a literate chromosome segregation machine. *Mol. Microbiol.*, **64**, 1434–1441.
- Sherratt, D., Søballe, B., Barre, F., Filipe, S., Lau, I., Massey, T. and Yates, J. (2004) Recombination and chromosome segregation. *Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **359**, 61–69.
- Grindley, N., Whiteson, K. and Rice, P. (2006) Mechanisms of site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 567–605.
- Bregu, M., Sherratt, D. and Colloms, S. (2002) Accessory factors determine the order of strand exchange in Xer recombination at psi. *EMBO J.*, **21**, 3888–3897.
- Aussel, L., Barre, F., Aroyo, M., Stasiak, A., Stasiak, A. and Sherratt, D. (2002) FtsK Is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell*, **108**, 195–205.
- Colloms, S., McCulloch, R., Grant, K., Neilson, L. and Sherratt, D. (1996) Xer-mediated site-specific recombination in vitro. *EMBO J.*, **15**, 1172–1181.
- Val, M., Bouvier, M., Campos, J., Sherratt, D., Cornet, F., Mazel, D. and Barre, F. (2005) The single-stranded genome of phage CTX is the form used for integration into the genome of *Vibrio cholerae*. *Mol. Cell*, **19**, 559–566.
- Barre, F., Aroyo, M., Colloms, S., Helfrich, A., Cornet, F. and Sherratt, D. (2000) FtsK functions in the processing of a Holliday junction intermediate during bacterial chromosome segregation. *Genes Dev.*, **14**, 2976–2988.
- Massey, T., Mercogliano, C., Yates, J., Sherratt, D. and Löwe, J. (2006) Double-stranded DNA translocation: structure and mechanism of hexameric FtsK. *Mol. Cell*, **23**, 457–469.
- Bigot, S., Saleh, O., Lesterlin, C., Pages, C., El Karoui, M., Dennis, C., Grigoriev, M., Allemand, J., Barre, F. and Cornet, F. (2005) KOPS: DNA motifs that control *E. coli* chromosome segregation by orienting the FtsK translocase. *EMBO J.*, **24**, 3770–3780.
- Levy, O., Ptacin, J., Pease, P., Gore, J., Eisen, M., Bustamante, C. and Cozzarelli, N. (2005) Identification of oligonucleotide sequences that direct the movement of the *Escherichia coli* FtsK translocase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 17618–17623.
- Bigot, S., Saleh, O., Cornet, F., Allemand, J. and Barre, F. (2006) Oriented loading of FtsK on KOPS. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 1026–1028.
- Ptacin, J., Nöllmann, M., Bustamante, C. and Cozzarelli, N. (2006) Identification of the FtsK sequence-recognition domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 1023–1025.
- Sivanathan, V., Allen, M., de Bekker, C., Baker, R., Arciszewska, L., Freund, S., Bycroft, M., Löwe, J. and Sherratt, D. (2006) The FtsK gamma domain directs oriented DNA translocation by interacting with KOPS. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 965–972.
- Löwe, J., Ellonen, A., Allen, M., Atkinson, C., Sherratt, D. and Grainge, I. (2008) Molecular mechanism of sequence-directed DNA loading and translocation by FtsK. *Mol. Cell*, **31**, 498–509.
- Graham, J., Sivanathan, V., Sherratt, D. and Arciszewska, L. (2010) FtsK translocation on DNA stops at XerCD-dif. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 72–81.
- Bonné, L., Bigot, S., Chevalier, F., Allemand, J. and Barre, F. (2009) Asymmetric DNA requirements in Xer recombination activation by FtsK. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 2371–2380.
- Yates, J., Zhekov, I., Baker, R., Eklund, B., Sherratt, D. and Arciszewska, L. (2006) Dissection of a functional interaction between the DNA translocase, FtsK, and the XerD recombinase. *Mol. Microbiol.*, **59**, 1754–1766.
- Possoz, C., Ribard, C., Gagnat, J., Pernodet, J. and Guérou, M. (2001) The integrative element pSAM2 from *Streptomyces*: kinetics and mode of conjugal transfer. *Mol. Microbiol.*, **42**, 159–166.
- Wu, L. and Errington, J. (1994) *Bacillus subtilis* SpoIIIE protein required for DNA segregation during asymmetric cell division. *Science*, **264**, 572–575.
- Val, M., Kennedy, S., El Karoui, M., Bonné, L., Chevalier, F. and Barre, F. (2008) FtsK-dependent dimer resolution on multiple chromosomes in the pathogen *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet.*, **4**, e1000201.
- Biller, S. and Burkholder, W. (2009) The *Bacillus subtilis* SftA (YtpS) and SpoIIIE DNA translocases play distinct roles in growing cells to ensure faithful chromosome partitioning. *Mol. Microbiol.*, **74**, 790–809.
- Kaimer, C., González-Pastor, J. and Graumann, P. (2009) SpoIIIE and a novel type of DNA translocase, SftA, couple chromosome segregation with cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, **74**, 810–825.
- Hallet, B. and Sherratt, D. (1997) Transposition and site-specific recombination: adapting DNA cut-and-paste mechanisms to a

- variety of genetic rearrangements. *FEMS Microbiol. Rev.*, **21**, 157–178.
27. Recchia, G. and Sherratt, D. (1999) Conservation of xer site-specific recombination genes in bacteria. *Mol. Microbiol.*, **34**, 1146–1148.
 28. Le Bourgeois, P., Bugarel, M., Campo, N., Daveran-Mingot, M., Labonté, J., Lanfranchi, D., Lautier, T., Pagès, C. and Ritzenthaler, P. (2007) The unconventional Xer recombination machinery of Streptococci/Lactococci. *PLoS Genet.*, **3**, e117.
 29. Carnoy, C. and Roten, C. (2009) The dif/Xer recombination systems in proteobacteria. *PLoS ONE*, **4**, e6531.
 30. Cornet, F., Mortier, I., Patte, J. and Louarn, J. (1994) Plasmid pSC101 harbors a recombination site, psi, which is able to resolve plasmid multimers and to substitute for the analogous chromosomal Escherichia coli site dif. *J. Bacteriol.*, **176**, 3188–3195.
 31. Cornet, F., Louarn, J., Patte, J. and Louarn, J. (1996) Restriction of the activity of the recombination site dif to a small zone of the Escherichia coli chromosome. *Genes Dev.*, **10**, 1152–1161.
 32. Sivanathan, V., Emerson, J., Pages, C., Cornet, F., Sherratt, D. and Arciszewska, L. (2009) KOPS-guided DNA translocation by FtsK safeguards Escherichia coli chromosome segregation. *Mol. Microbiol.*, **71**, 1031–1042.
 33. Maguin, E., Prévost, H., Ehrlich, S. and Gruss, A. (1996) Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.*, **178**, 931–935.
 34. Pérals, K., Cornet, F., Merlet, Y., Delon, I. and Louarn, J. (2000) Functional polarization of the Escherichia coli chromosome terminus: the dif site acts in chromosome dimer resolution only when located between long stretches of opposite polarity. *Mol. Microbiol.*, **36**, 33–43.
 35. Arciszewska, L. and Sherratt, D. (1995) Xer site-specific recombination in vitro. *EMBO J.*, **14**, 2112–2120.
 36. de Massy, B., Dorgai, L. and Weisberg, R. (1989) Mutations of the phage lambda attachment site alter the directionality of resolution of Holliday structures. *EMBO J.*, **8**, 1591–1599.
 37. Lee, J. and Jayaram, M. (1995) Junction mobility and resolution of Holliday structures by Flp site-specific recombinase. Testing partner compatibility during recombination. *J. Biol. Chem.*, **270**, 19086–19092.
 38. Capioux, H., Lesterlin, C., Pérals, K., Louarn, J. and Cornet, F. (2002) A dual role for the FtsK protein in Escherichia coli chromosome segregation. *EMBO Rep.*, **3**, 532–536.
 39. Bigot, S., Corre, J., Louarn, J., Cornet, F. and Barre, F. (2004) FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein. *Mol. Microbiol.*, **54**, 876–886.
 40. Dubarry, N. and Barre, F. (2010) Fully efficient chromosome dimer resolution in Escherichia coli cells lacking the integral membrane domain of FtsK. *EMBO J.*, **29**, 597–605.
 41. Pérals, K., Capioux, H., Vincourt, J., Louarn, J., Sherratt, D. and Cornet, F. (2001) Interplay between recombination, cell division and chromosome structure during chromosome dimer resolution in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.*, **39**, 904–913.
 42. Yates, J., Aroyo, M., Sherratt, D. and Barre, F. (2003) Species specificity in the activation of Xer recombination at dif by FtsK. *Mol. Microbiol.*, **49**, 241–249.
 43. Blakely, G., May, G., McCulloch, R., Arciszewska, L., Burke, M., Lovett, S. and Sherratt, D. (1993) Two related recombinases are required for site-specific recombination at dif and cer in E. coli K12. *Cell*, **75**, 351–361.
 44. Arciszewska, L., Grainge, I. and Sherratt, D. (1995) Effects of Holliday junction position on Xer-mediated recombination in vitro. *EMBO J.*, **14**, 2651–2660.
 45. Sciochetti, S., Piggot, P. and Blakely, G. (2001) Identification and characterization of the dif Site from Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.*, **183**, 1058–1068.
 46. Steiner, W. and Kuempel, P. (1998) Cell division is required for resolution of dimer chromosomes at the dif locus of Escherichia coli. *Mol. Microbiol.*, **27**, 257–268.
 47. Kennedy, S., Chevalier, F. and Barre, F. (2008) Delayed activation of Xer recombination at dif by FtsK during septum assembly in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.*, **68**, 1018–1028.
 48. Leslie, N. and Sherratt, D. (1995) Site-specific recombination in the replication terminus region of Escherichia coli: functional replacement of dif. *EMBO J.*, **14**, 1561–1570.
 49. Lin, N., Chang, R., Lee, S. and Tseng, Y. (2001) Plasmids carrying cloned fragments of RF DNA from the filamentous phage (phi)Lf can be integrated into the host chromosome via site-specific integration and homologous recombination. *Mol. Genet. Genomics*, **266**, 425–435.
 50. Gonzalez, M., Lichtensteiger, C., Caughlan, R. and Vimr, E. (2002) Conserved filamentous prophage in Escherichia coli O18:K1:H7 and Yersinia pestis biovar orientalis. *J. Bacteriol.*, **184**, 6050–6055.
 51. Hamilton, H., Domínguez, N., Schwartz, K., Hackett, K. and Dillard, J. (2005) Neisseria gonorrhoeae secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Mol. Microbiol.*, **55**, 1704–1721.

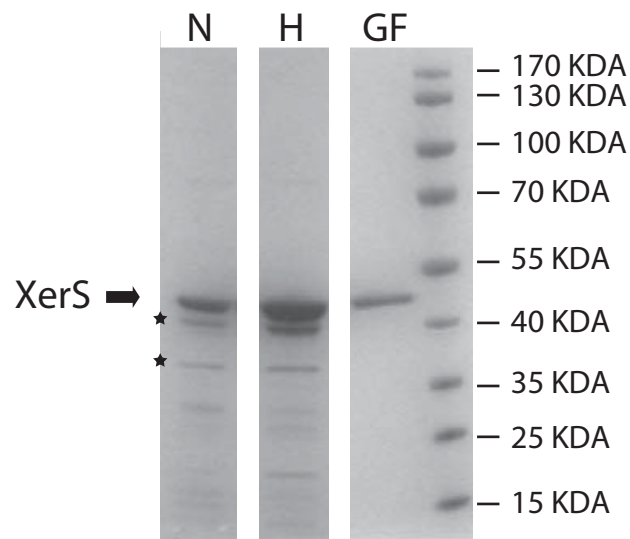


Figure S1: Purification of XerS.

SDS-PAGE analysis of XerS purification. Strain BL21(DE3) containing plasmid pCL255 was grown in L broth at 42°C to $OD_{600}=0.6$, then incubated at RT after addition of IPTG (0.1 mM) for 3 hours. Cells were recovered by centrifugation, resuspended in lysis buffer and sonicated. The resulting lysate was cleared by centrifugation. His-FLAG-tagged XerS was purified on nickel resin (1 ml His-trap HP, GE Healthcare, N) followed by heparin (1 ml High-trap HP, GE Healthcare, H) and gel filtration (High-load 16/60 Superdex 200, GE Healthcare, GF) columns. The stars indicate truncated XerS forms that are detected in western-blot analysis using anti-FLAG antibodies. The gel was stained with coomassie blue.

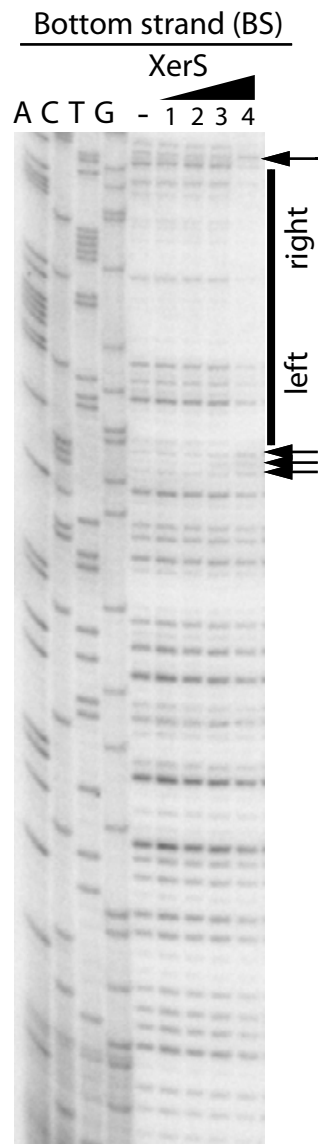


Figure S2: DNaseI footprinting of the bottom strand (BS) of *dif_{SL}*. Experiments were done at increasing XerS concentrations as described in Experimental procedures. A, C, T and G: ladder sequence of the *dif_{SL}*-containing substrate. -: no XerS. Lanes 1, 2, 3 and 4: 12.5, 25, 50 and 100nM of XerS, respectively. The regions protected from cleavage with the left-right orientation of the site are indicated by black bars and positions of increased cleavage by arrows.

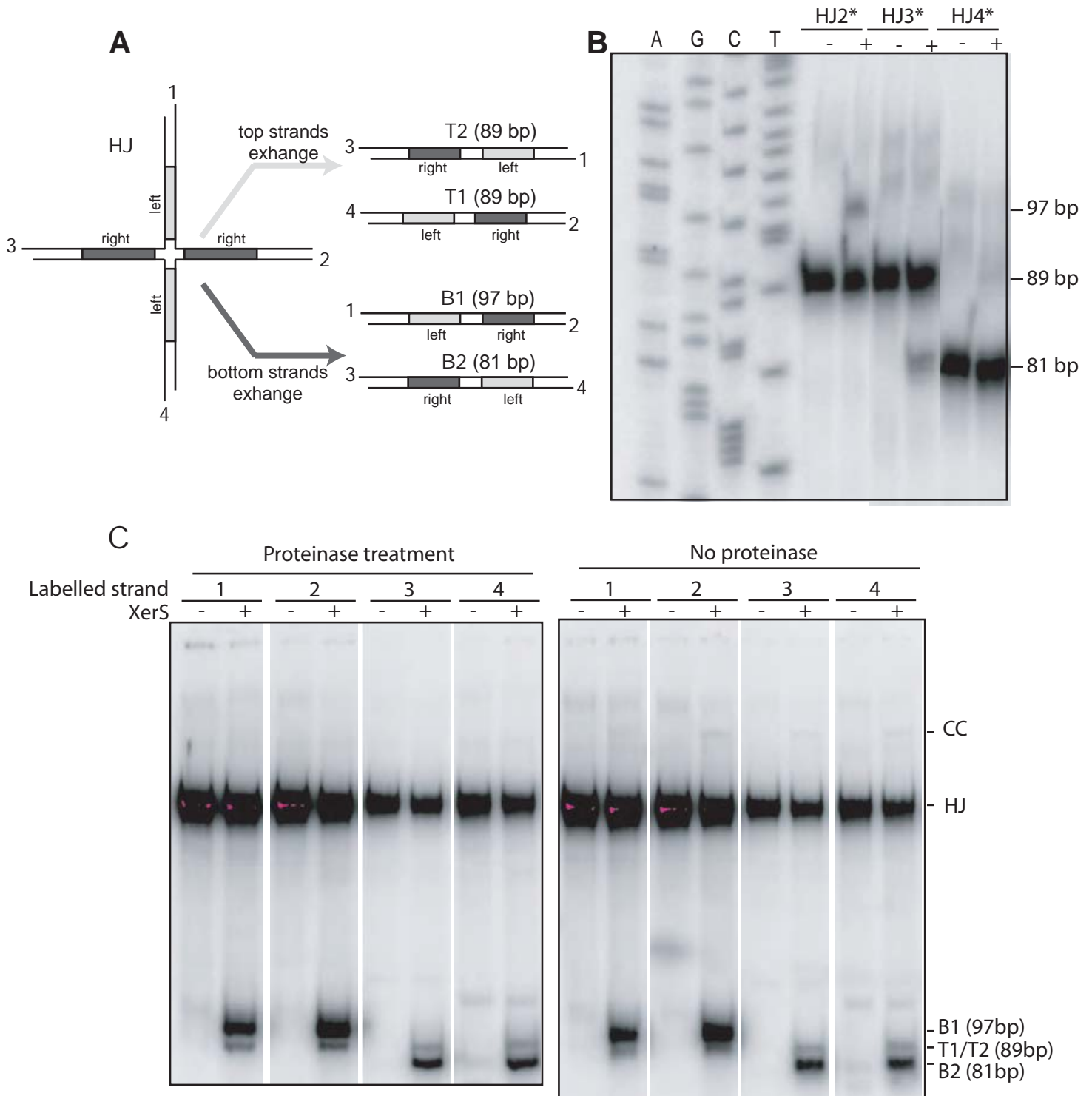


Figure S3: Strand exchange by XerS.

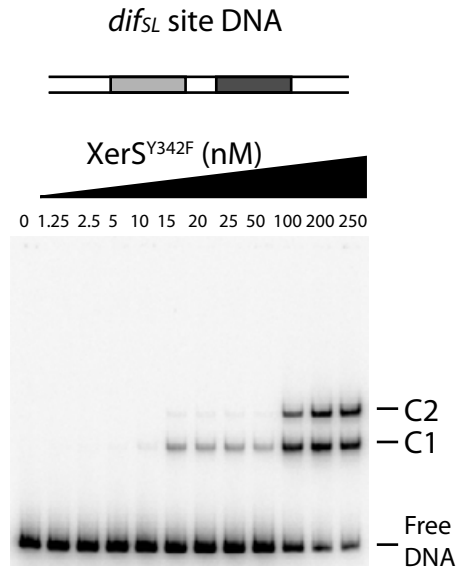
A) Left: diagram of the HJ substrate with the strand numbered. The left (pale grey) and right (dark grey) *dif_{SL}* half sites are indicated. Right: resolution products (T1, T2 and B1, B2; with their respective sizes indicated) obtained by exchange of either the top (1 and 4) or bottom (2 and 3) pairs of strands (see also Figure 2). B) Analysis of the individual DNA strands by denaturing PAGE. Positions of the labelled strands are indicated. (AGCT) lanes: size ladder (Experimental procedures). HJ2, 3 and 4: HJ substrates labelled on strands 2, 3 or 4, respectively; (-) lane: no XerS; (+) lane: reaction contained 200 nM XerS. C) PAGE analysis of the recombination products. Left: reaction were treated with proteinase. Right: the proteinase treatment was omitted. The positions of the substrate (HJ), B1, B2, T1 and T2 products indicated. CC indicated the position of XerS-DNA covalent complexes that are present only in the absence of proteinase treatment. (-) lane: no XerS; (+) lanes: reactions contained 200 mM XerS.

A

<i>L. lactis</i> XerS	297	RVTP H KL R HHTLATRLYAQTNSQVLVSNQLG H ASTQVTDL Y THIINEEQNALDNL----	357
<i>E. coli</i> XerD	234	KLSP H VL R HAFATHLLNHGADLRVVQMLLG H SDLSTTQI Y THVATERLRQLHQHHPRA	298
<i>H. influenzae</i> XerD	231	ALSP H VL R HAFATHLVNHGADLRVVQMLLG H TDLSTTQI Y THVAKERLKRLHERFHPRG	297
P1 Cre	279	AWSG H SAR V GGAARDMARAGVSIPEIMQAGG W TNVNIVMN Y IRNLDSETGAMVRLLEDGD	343

|
catalytic tyrosine

B



4 Binding of XerS^{Y342F} to *dif_{SL}*-containing DNA.

A) Alignment of tyrosine recombinases revealing the position of residues involved in catalysis in XerS (shown in red with the catalytic tyrosine indicated) . B) The substrates is cartooned on the top of the gel. XerS^{Y342F} concentrations are given in nM and the positions of the free DNA probes and the C1 and C2 XerS/DNA complexes are indicated.

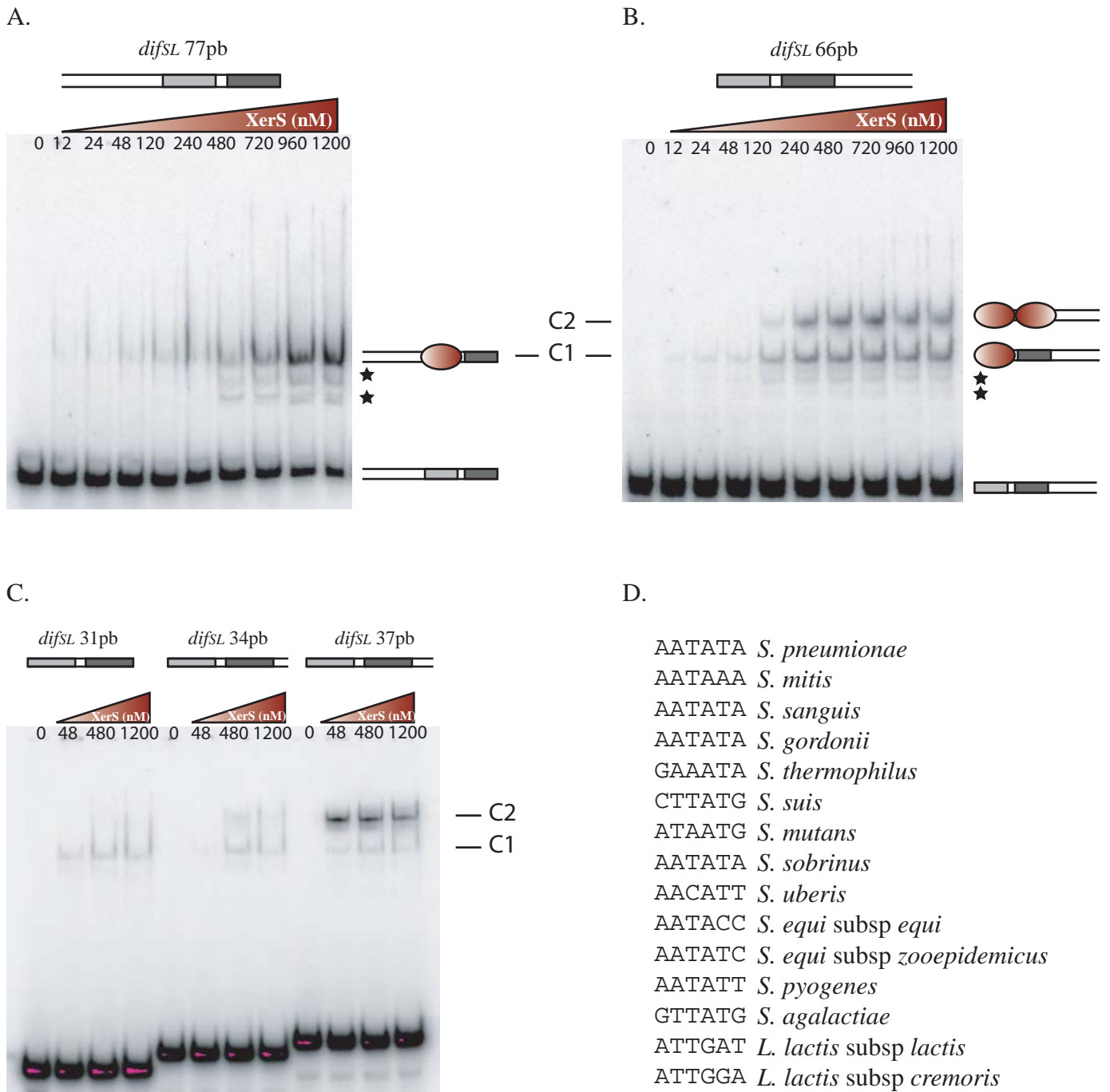


Figure 35. Séquence minimale nécessaire à la fixation de XerS *in vitro*.

Expériences de retards sur gel réalisées en utilisant un ADN de 77pb (**A**) ou de 66pb (**B**) possédant le site *difsL* à l'extrémité droite ou gauche, respectivement. Les concentrations en protéines utilisées sont indiquées pour chacune des pistes. L'échantillon protéique utilisé est le même que pour la figure 32. XerS n'est pas pure, de ce fait, les complexes indiqués par une étoile correspondent à la fixation spécifique de formes tronquées de la recombinase. L'ADN libre ainsi que les complexes nucléoprotéiques formés (C1 et C2) sont schématisés à droite des gels. Le bras de fixation gauche du site *difsL* est représenté par un rectangle gris clair et le bras droit par un rectangle gris foncé. XerS est représentée par un rond rouge. **C.** Expérience de retards sur gel réalisée en utilisant des ADN contenant le site *difsL* de 31pb et de 34pb et 37pb où 3pb et 6pb ont été ajoutées à droite du site. Les complexes formés, C1 et C2, sont indiqués. **D.** Alignement des 6pb à droite du site *difsL* chez différentes espèces de Streptocoques et de Lactocoques.

2. Résultats complémentaires

2.1- Définition de la longueur du site *dif_{SL}*

Le site *dif_{SL}* a été défini *in vivo* par la séquence minimale capable de recombiner. Il fait 31pb, c'est-à-dire que pour une région centrale de 6pb le site est asymétrique, le bras de fixation droit de XerS étant plus court que le bras de fixation gauche. *In vitro*, XerS se fixe très mal sur le site minimum de 31pb (Figure 35C). En effet, peu d'ADN est retardé, même aux concentrations en protéines les plus élevées. D'autre part, un seul complexe nucléoprotéique (C1) est observé, suggérant qu'un seul monomère de XerS se fixe sur l'ADN de 31pb. Associé au fait que les deux bras de fixation ont des longueurs différentes, ce résultat amène à se demander si on ne peut pas considérer que le site *dif_{SL}* a une taille plus importante.

Dans un premier temps, je voulais vérifier si le complexe observé était bien dû à la fixation de XerS sur un seul bras du site. De la même manière, je voulais savoir si en ajoutant de l'ADN à gauche ou à droite du site on pouvait restaurer la formation du deuxième complexe nucléoprotéique, constitué de deux monomères de XerS fixés sur le site. Pour cela, j'ai réalisée des expériences de retards sur gel en utilisant un ADN contenant le site *dif_{SL}* à l'extrémité droite (Figure 35A) ou à l'extrémité gauche (Figure 35B). Lorsque de l'ADN est ajouté à gauche du site (Figure 35A), on observe la formation d'un seul complexe nucléoprotéique qui pourrait correspondre à la fixation d'une seule protéine sur le site *dif_{SL}*. En revanche, lorsqu'on ajoute de l'ADN à droite du site on observe la formation des deux complexes (C1 et C2), correspondant à la fixation d'un et de deux monomères de XerS sur l'ADN (Nolivos *et al.*, 2010). Ce résultat permet de confirmer que le complexe observé sur la figure 35A correspond à une seule recombinase fixée sur l'ADN. Ce résultat démontre également qu'en absence d'ADN à droite du site, la recombinase ne se fixe pas sur le bras de fixation droit.

Afin d'affiner le résultat obtenu, j'ai réalisé des expériences de retards sur gel en augmentant de 3pb ou de 6pb la taille du site *dif_{SL}* (Figure 35C). Sur l'ADN de 31pb on observe le complexe nucléoprotéique C1 et dès qu'on ajoute 3pb (*dif_{SL}* 34pb) on constate la formation du complexe C2. Sur l'ADN de 37pb, une quantité plus importante de complexe C2 est formé, suggérant qu'en augmentant la taille de l'ADN on favorise l'interaction de XerS avec son site. Ces résultats nous indiquent que la formation du deuxième complexe nucléoprotéique, C2, et donc la fixation de XerS sur le bras droit du site, nécessite entre 1 et

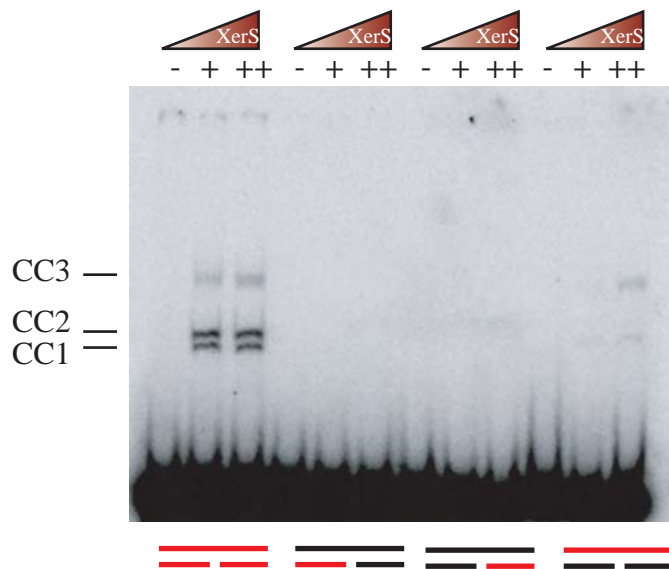


Figure 36. Expérience utilisant un substrat suicide.

Le substrat utilisé fait 37pb et a été obtenu par hybridation de 3 oligonucléotides, comme schématisé en dessous du gel. Les brins marqués radioactivement en 5' sont représentés en rouge. Le substrat suicide a été incubé en absence (-) ou en présence (+ et ++) de 1,3 et 3 μ M de la recombinase XerS. La réaction a été arrêtée par ajout de SDS et d'EDTA, puis déposée sur gel dénaturant. Trois complexes covalents sont observés (CC1, CC2, et CC3) lorsque le substrat est marqué sur les trois oligonucléotides.

3pb supplémentaires. D'autre part, lorsqu'on considère la conservation des 6pb à droite du site *dif_{SL}* chez différentes espèces de Streptocoques, on remarque que les bases ne sont pas conservées, suggérant que la séquence n'est pas importante pour la fixation de la recombinase (Figure 35D). Néanmoins, la nécessité de quelques bases à droite du site *dif_{SL}* est en accord avec l'expérience d'empreinte à la DNaseI réalisée précédemment (Nolivos *et al.*, 2010) qui indique que XerS couvre jusqu'à 4pb supplémentaires à droite et 1pb à gauche du site.

Toutes les données obtenues suggèrent que le site *dif_{SL}* est plus long, de 2 ou 3pb, que celui défini *in vivo*. D'autre part, la séquence des quelques bases nécessaires à droite du site ne semble pas intervenir dans la spécificité de reconnaissance de l'ADN par XerS. Je n'ai pas réalisée d'analyse de la spécificité des bases du site, mais les 3 premières paires de bases du site ne sont pas strictement conservées et il est possible qu'elles n'interviennent pas non plus dans la spécificité de fixation de XerS. Il semble donc que, bien que la nature des bases ne soit pas importante, la taille du site *dif_{SL}* doit être considérée de 33 ou 34pb, ce qui permet de définir des bras de fixation de la recombinase de longueur identique.

2.2- Définition de la région centrale

Un point important que je n'ai pas pu résoudre durant ma thèse, est la définition des différentes parties qui constituent le site de recombinaison, à savoir les deux bras de fixation et la région centrale. Ceci est dû au fait que je n'ai pas réussi à déterminer les points de coupure par la recombinase XerS. Classiquement, pour définir les points de coupure des recombinases à tyrosine, on utilise des substrats suicides qui piègent l'intermédiaire de la réaction de coupure où la recombinase est liée de manière covalente à l'ADN. Les substrats suicides correspondent à la séquence du site de recombinaison dans laquelle on a introduit une interruption simple brin (« *nick* ») dans la région centrale, à quelques nucléotides du point de coupure potentiel. Lorsque la recombinase attaque le phosphate scissile, les quelques bases situées entre la coupure et le « *nick* » diffusent, ce qui empêche la réaction inverse (la religature) de se produire et piège la liaison phosphotyrosyl créée. J'ai utilisée de tels substrats pour définir les positions des phosphates scissiles sur le brin supérieur et sur le brin inférieur du site *dif_{SL}*. J'ai testé des substrats de longueurs différentes, en positionnant le « *nick* » à différents endroits de la région cœur. Tous les substrats utilisés m'ont permis de piéger des liaisons covalentes entre la protéine et l'ADN (Figure 36). Cependant, je n'ai pas pu corrélérer les profils observés aux différents marquages utilisés. En effet, dans l'exemple présenté figure 36, lorsque le substrat est marqué en même temps sur les 3 oligonucléotides on observe 3

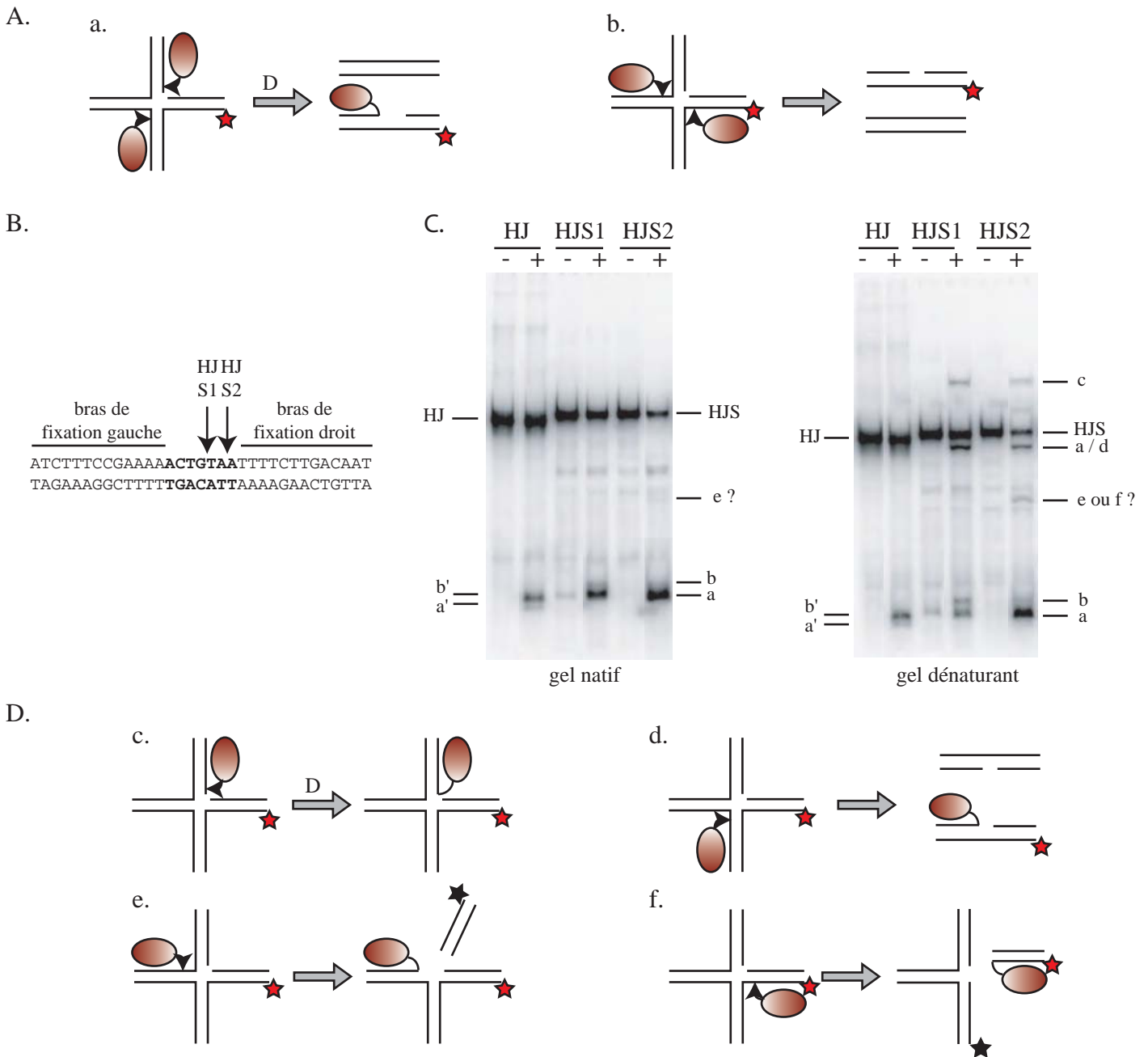


Figure 37. Résolution d'une jonction de Holliday suicide.

A. Résolution du substrat par l'échange des brins supérieurs (a) ou inférieurs (b). Les brins d'ADN formant la jonction de Holliday suicide sont schématisés par des traits. Le « nick » est représenté par une interruption du brin d'ADN situé en haut à droite de la jonction de Holliday suicide. Pour plus de clarté, seulement les recombinases XerS actives (ronds rouges) sont représentées. La flèche noire indique le brin coupé par chacune des protéines. Les produits obtenus sont schématisés à droite de chaque substrat. L'étoile rouge indique le marquage radioactif en 5' utilisé lors de l'expérience présentée en C. **a.** La résolution entraîne la formation d'un complexe covalent, après diffusion (D) de l'oligonucléotide situé entre la coupure et le « nick ». **b.** Aucun complexe covalent n'est formé. **B.** La position du « nick » pour les substrats utilisés figure C est indiquée par une flèche sur la séquence du site *difs_L*. **C.** Réaction de résolution d'une jonction de Holliday suicide (HJS), déposés sur gel natif (à gauche) et sur gel dénaturant (à droite). Les deux premières pistes correspondent à la résolution d'une jonction de Holliday classique (HJ). Les réactions ont été incubées en absence (-) ou en présence (+) de XerS. La nature des substrats (HJ et HJS) et des produits est indiquée par la lettre correspondant au schémas en A et en D. a' et b' font référence aux produits a et b mais pour la jonction de Holliday classique. La présence d'un point d'interrogation fait référence à l'incertitude sur la nature du produit observé. **D.** Produits potentiellement obtenus après coupure par une seule recombinase. La représentation utilisée est la même qu'en A. L'étoile noire, pour les produits e et f, indique le marquage radioactif en 3' utilisé pour définir la position de la coupure par XerS.

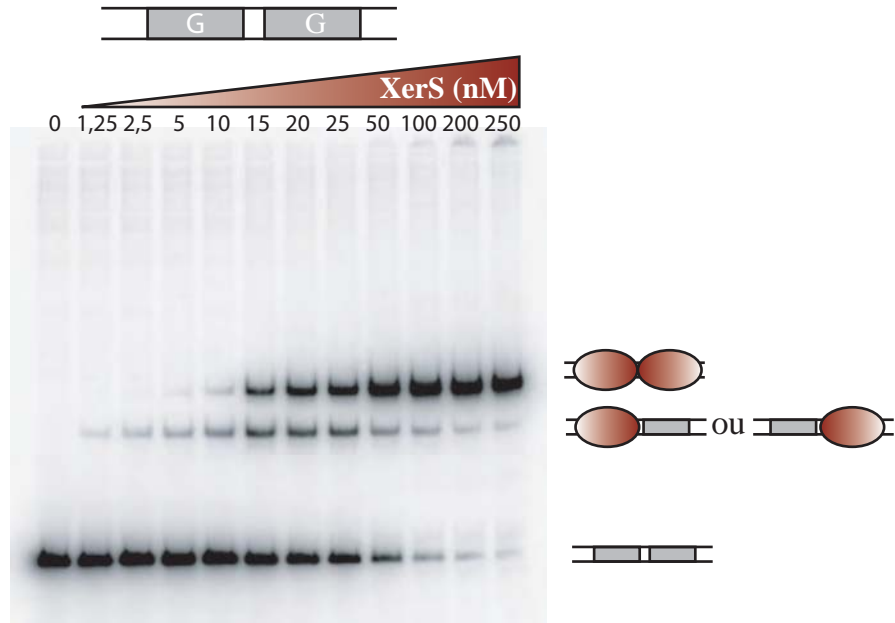
complexes covalents différents (CC1, CC2, et CC3). Lorsque le substrat est marqué sur chacun des oligonucléotides indépendamment, on ne retrouve pas ces trois complexes (Figure 36). De ce fait, je n'ai pas pu définir, en fonction du substrat et du marquage utilisé, quel(s) brin(s) est(sont) attaqué(s) par la recombinase. D'autre part, très peu de coupure est observée, ce qui ne m'a pas permis de déterminer précisément sur gel dénaturant les positions des différentes coupures observées.

XerS résolvant efficacement une jonction de Holliday synthétique, j'ai décidé par la suite d'utiliser des jonctions de Holliday « suicides » en positionnant le « *nick* » à différents endroits de la région centrale (Figure 37B). Les jonctions de Holliday suicides sont résolues, comme schématisé figure 37A, puisque XerS est capable de réaliser les échanges de brins dans les deux sens (Nolivos *et al.*, 2010). D'autre part, le brin partenaire de celui qui possède un « *nick* » est intact, permettant de réaliser l'échange de brins mais seulement une ligature (Figure 37Aa). Le profil obtenu avec une jonction de Holliday suicide est présenté figure 37C. Sur gel natif, après digestion à la protéinase K, on observe les produits de recombinaison « a » et « b » schématisés figure 37A. On remarque que les produits des jonctions suicides migrent différemment de ceux obtenus avec une jonction de Holliday classique (HJ). Ceci peut être dû à la présence du « *nick* », qui modifie la mobilité électrophorétique de l'ADN. On remarque également que le produit « a » est obtenu en plus grande quantité que le produit « b ». Ceci peut s'expliquer par le fait que la jonction suicide peut être « résolue » par une seule coupure, comme schématisé en « d » figure 37D. Sur gel dénaturant, des liaisons covalentes sont piégées (Figure 37C). Elles sont visibles sur gel SDS mais pas sur gel natif après traitement à la protéinase K. Trois complexes covalents différents sont détectés, ce qui indique que, en plus du complexe « a » schématisé Figure 37A, des événements où une seule recombinase a coupé se sont produits (Figure 37D). Parmi les différents produits potentiellement obtenus après coupure par une seule recombinase, les événements « e » et « f » permettent de définir précisément la coupure, lorsqu'ils sont marqués en 3' (comme indiqué par l'étoile noire) (Figure 37D). L'expérience a été réalisée mais n'a pas non plus permis de définir la coupure sur gel dénaturant.

2.3- Etude de l'asymétrie des bras de fixation du site *dif_{SL}*

Bien que le système XerS/*dif_{SL}* n'est constitué que d'une seule recombinase, on retrouve une asymétrie dans la fixation au site de recombinaison et dans la résolution de la jonction de Holliday. Dans les systèmes Xer « classiques », cette asymétrie provient de la

A.



B.

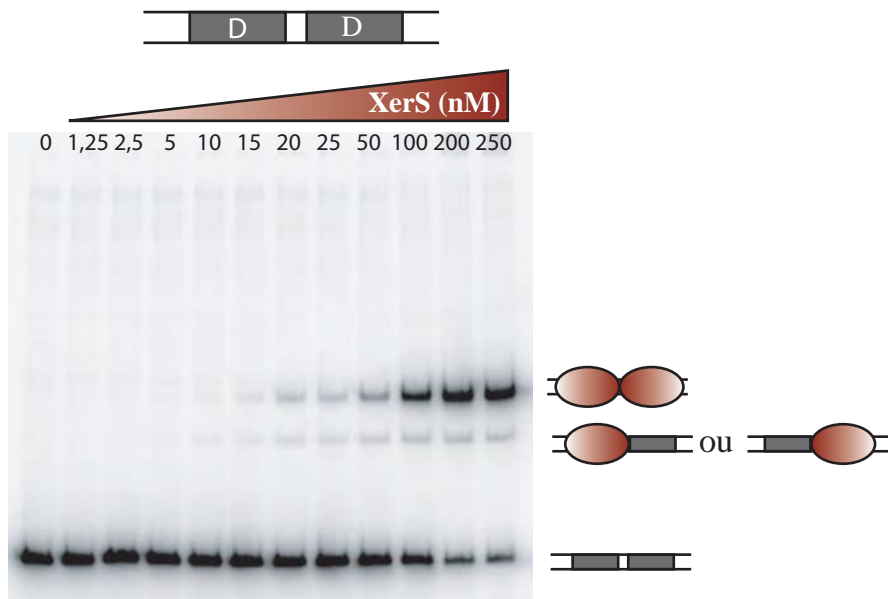


Figure 38. Fixation de XerS sur les sites 2G et 2D.

Le site *difsL* a été muté en site 2G (A), où le bras de fixation droit a été remplacé par le bras de fixation gauche, et en site 2D (B), où le bras de fixation gauche a été remplacé par le bras de fixation droit. Les expériences de retards sur gel ont été réalisées en présence de concentrations croissantes en protéine XerS, indiquées pour chacune des pistes. L'ADN libre et les complexes nucléoprotéiques formés sont schématisés à droite des gels, selon la représentation décrite Figure 35.

présence de deux recombinases à tyrosine différentes et de la séquence du site de recombinaison, au niveau des bras de fixation et de la région centrale. Pour le système Xer des Streptocoques, l'asymétrie provient seulement du site *dif_{SL}*. Il est intéressant de noter que ce système conserve une asymétrie au niveau des bras de fixation de la recombinase alors que les autres systèmes comme Cre/*loxP* ou Flp/*FRT* possèdent des sites de recombinaison dont la séquence des deux bras de fixation est identique (Figure 3). Pour étudier plus en détail l'importance de cette asymétrie dans la réaction de recombinaison, j'ai construit des sites dont les bras de fixation de la recombinase sont symétriques. Dans un premier temps, je voulais savoir si le mode de fixation au site de recombinaison est conservé lorsque l'affinité de la protéine pour les deux bras de fixation est identique. Dans un deuxième temps, je me suis intéressée à l'importance de cette asymétrie dans la réaction d'échange de brins.

2.3.1- XerS se fixe de manière coopérative sur un site symétrique

J'ai réalisé des expériences de retards sur gel en utilisant des sites constitués soit de deux bras gauche (2G), soit de deux bras droit (2D) (Figure 38). XerS ayant une forte affinité pour la séquence du bras gauche, on observe à faible concentration en protéines la formation d'un premier complexe constitué de l'ADN portant le site 2G, sur lequel est positionnée une seule recombinase (Figure 38A). Lorsque la concentration en XerS atteint 5nM, un deuxième complexe de plus haut poids moléculaire se forme, correspondant à la fixation de deux monomères sur le site. Ce profil est similaire au profil obtenu avec le site *dif_{SL}* natif (Figure 2, Nolivos *et al.*, 2010) et indique que XerS se fixe sur le site 2G de manière coopérative. D'autre part, en remplaçant une séquence pour laquelle XerS a une faible affinité (bras D), par une séquence pour laquelle elle a une forte affinité (bras G), on pourrait s'attendre à observer une différence entre les profils de fixation obtenus avec le site 2G et le site sauvage. Cependant, ce n'est pas le cas, il n'apparaît pas évident que XerS a une meilleure affinité sur le site 2G (Comparaison figure 38A et figure 2 de Nolivos *et al.*, 2010).

XerS a une plus faible affinité pour le site 2D, constitué de deux bras droit (Figure 38B). Le profil obtenu est différent du précédent puisque les deux complexes nucléoprotéiques, constitué d'une et de deux protéines, apparaissent à la même concentration protéique (10nM). D'autre part, alors qu'on observe une augmentation de la formation du complexe de plus faible mobilité électrophorétique en fonction de la concentration en protéines, la quantité du deuxième complexe semble peu varier. Ce résultat suggère que le complexe formé d'un ADN et d'une protéine est rapidement chassé dans le complexe de plus

haut poids moléculaire par la fixation d'un deuxième monomère de XerS. Il semblerait donc que la coopérativité de fixation est plus forte sur le site constitué de deux bras droit. L'affinité de XerS pour ce bras du site étant faible, on peut penser que le complexe est plus stable quand deux monomères sont fixés, peut être grâce aux interactions qui sont faites entre les deux recombinases, ce qui pourrait expliquer la plus forte coopérativité apparente. Ce résultat est en accord avec le profil obtenu sur le site *dif_{SL}* où le bras gauche a été muté (Nolivos *et al.*, 2010). En effet, bien que très peu de protéines soient complexées à l'ADN, des complexes contenant deux protéines sont formés.

Le site constitué de deux bras de fixation droit apparaît être un mauvais substrat pour XerS de part la faible affinité de la protéine pour cette séquence. En revanche, la fixation de la recombinase sur l'ADN contenant le site 2G donne le même profil que celui obtenu avec le site *dif_{SL}* natif. Une différence entre les deux modes de fixation pourrait provenir de l'ordre d'assemblage. En effet, XerS ayant la même affinité pour les séquences des deux bras du site modifié, on peut supposer que le premier complexe formé comprend en quantité équivalente des complexes où la protéine est fixée à droite de la région centrale et des complexes où XerS est positionnée à gauche de la région centrale. Néanmoins, je ne peux pas exclure la possibilité que l'interaction de XerS avec la région centrale, dont la séquence est asymétrique, puisse tout de même favoriser un ordre d'assemblage sur le site symétrique. En effet, il a été proposé dans le cas de la recombinase Cre, par l'étude de la courbure du site *loxP* en présence d'une et de deux protéines, qu'il y aurait une préférence d'assemblage sur le site (Lee *et al.*, 2003). Le modèle propose que le premier monomère se fixe sur le site adjacent au phosphate scissile attaqué lors de la première réaction de coupure. Si c'est également le cas pour la fixation de XerS sur le site symétrique, il serait possible de le visualiser en réalisant une empreinte à la DNaseI sur le complexe. Une deuxième différence entre l'assemblage de XerS sur le site *dif_{SL}* et sur le site 2G pourrait provenir de la courbure de l'ADN. En effet, il est possible que l'asymétrie de fixation au site de recombinaison assure la courbure particulière qui impose la première coupure. Sur le site symétrique, on peut imaginer que les deux courbures possibles puissent se faire à la même fréquence ou qu'au contraire, on perde la courbure nécessaire à la réaction de recombinaison.

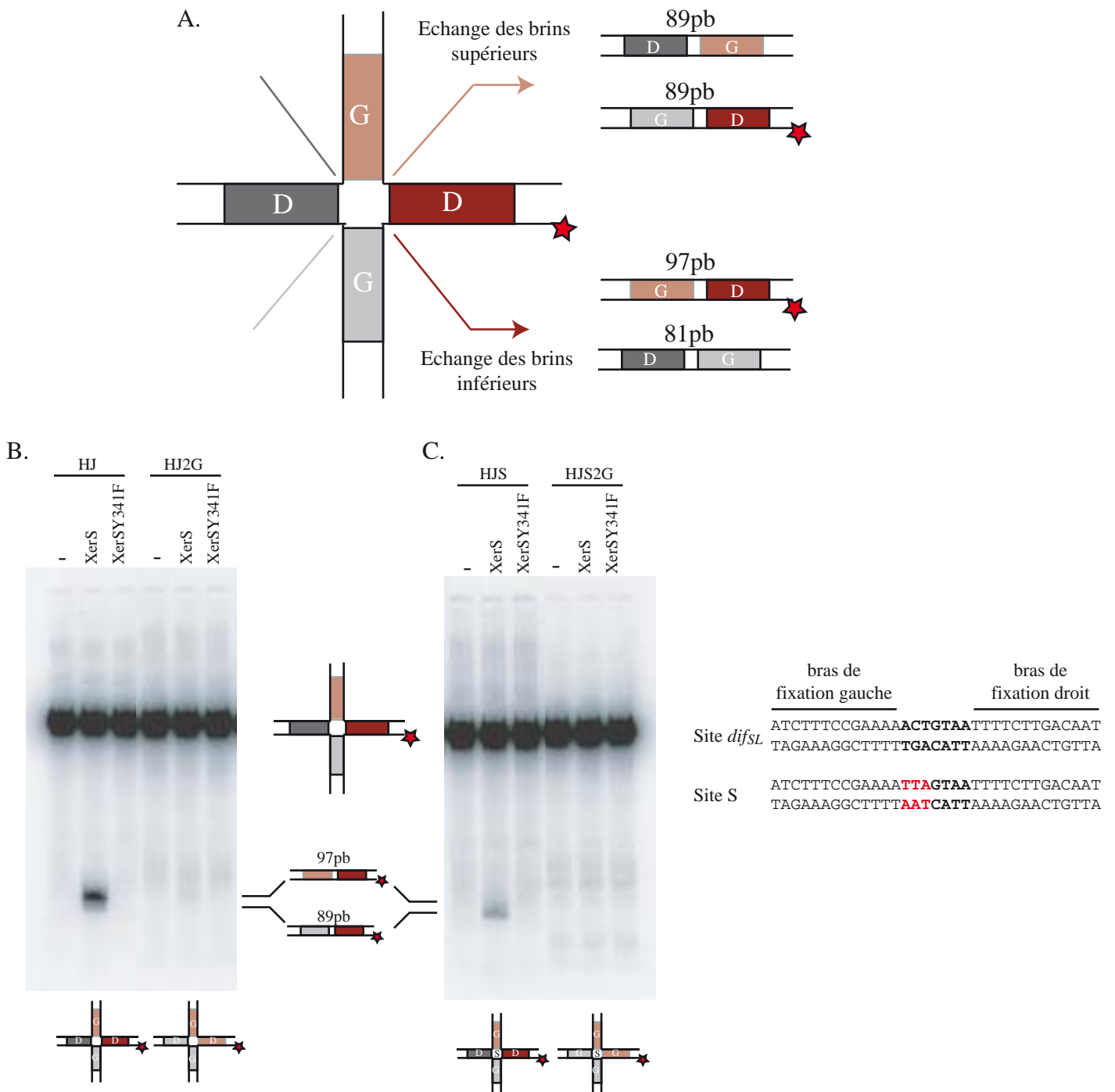


Figure 39. Résolution de jonctions de Holliday symétriques et « pseudo symétriques ».

A. Représentation schématique de la jonction de Holliday et des produits obtenus après résolution. Les bras de fixation droits (D) sont représentés par des rectangles gris et rouge foncé. Les bras de fixation gauches (G) sont schématisés par des rectangles gris et rouge clair. Les produits de recombinaison obtenus après résolution de la jonction par l'échange des brins supérieurs (89 pb) et par l'échange des brins inférieurs (97pb et 81pb) sont indiqués. L'étoile rouge indique la position du marquage radioactif, et de ce fait les différentes formes qu'on peut observer après révélation du gel. **B.** Résolution d'une jonction de Holliday contenant le site *difSL* (HJ) ou le site 2G (HJ2G). Les réactions ont été réalisées en absence de recombinase (-), en présence de 50nM de XerS ou de XerSY341F. La jonction de Holliday ainsi que les produits de résolution obtenus sont schématisés à droite du gel, comme en A. **C.** Résolution d'une jonction de Holliday contenant le site dont la région centrale est symétrique (HJS) et le site 2G dont la région centrale est symétrique (HJS2G). La séquence du site S est indiquée à droite. Les bases mutées dans la région centrale sont représentées en rouge.

2.3.2- L'asymétrie des bras de fixation est nécessaire à la résolution de la jonction de Holliday

Afin de mieux comprendre l'importance de l'asymétrie des bras de fixation et/ou de la région centrale, j'ai réalisée des expériences de résolution de jonction de Holliday en utilisant le site symétrique 2G. Je voulais savoir si cette asymétrie était importante pour la directionnalité de la réaction de recombinaison. En effet, si l'asymétrie dicte l'ordre d'échange de brin, on peut imaginer qu'avec le site « pseudo symétrique » 2G, la réaction puisse se faire dans les deux sens avec la même fréquence, on s'attend alors à obtenir les deux produits de résolution de la jonction de Holliday en quantité équivalente. On peut également imaginer que la même affinité des monomères pour les bras du site empêche la formation de la courbure nécessaire à la réaction de recombinaison. Dans ce cas, on s'attend à ce qu'il n'y ait pas de résolution de la jonction de Holliday. En revanche, si l'asymétrie des bras n'est pas importante pour la réaction de recombinaison, cela signifie qu'on a créé un système comme *Cre/loxP*, c'est-à-dire que l'asymétrie de la région centrale est suffisante pour diriger la réaction de recombinaison. Le profil de résolution de la jonction de Holliday devrait alors être similaire à celui obtenu avec le site *dif_{SL}*.

J'ai donc comparé la résolution d'une jonction de Holliday avec le site *dif_{SL}* (HJ) et une jonction de Holliday avec le site symétrique (HJ2G) (Figure 39). La jonction de Holliday utilisée est identique à celle utilisée précédemment (Nolivos *et al.*, 2010). Elle permet de définir la paire de brins échangée, par la taille des produits de résolution de la jonction obtenus (Figure 39A). Les réactions ont été effectuées en absence (-) de recombinase, en présence de XerS ou en présence de la protéine catalytiquement inactive XerSY341F (Figure 39B). La jonction HJ, constituée du site natif, est résolue dans les deux sens et préférentiellement par l'échange des brins inférieurs par XerS. Ce résultat indique que c'est le monomère fixé sur le bras droit du site qui a réalisé les réactions de coupure et d'échange de brins. En revanche, la jonction HJ2G n'est pas ou peu résolue par la recombinase. Ce résultat indique donc que l'asymétrie des bras de fixation est primordiale pour la résolution de la jonction de Holliday et donc pour la réaction de recombinaison. Il semble tout de même qu'on observe une faible quantité de produit de 97pb (ligne 5, Figure 39B) qui correspond à la résolution de la jonction de Holliday via l'échange des brins inférieurs. De ce fait, bien qu'on inhibe une grande partie de la réaction, il apparaît que le sens de résolution reste conservé. Ce résultat laisse penser que l'asymétrie de la région centrale pourrait dicter le sens de résolution de la jonction de Holliday. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai créé une jonction de Holliday

A.

	1	5	10	15	20	25	30	
Site <i>difsL</i>	ATCTTTCCGAAAACTGTAATTTTCTTGACAAT							
	TAGAAAGGCTTTTTGACATTAAGAAGAACTGTTA							
Site 2G	ATCTTTCCGAAAACTGTAATTTTCT GGAAAG AT							
	TAGAAAGGCTTTTTGACATTAAGA CCTT CTA							
Site 2D	AT TGTCA AGAAAACTGTAATTTTCTTGACAAT							
	TA ACAGTT CTTTTTGACATTAAGAAGAACTGTTA							

B.

	1	5	10	15	20	25	30		
	AT CTTTCC GAAAACTATAATTTT CTTG AAAA								<i>S. pneumionae</i> R6
	AT CTTTCT GAAAACTATAATTTT CTTG AAAA								<i>S. pneumionae</i> 670-6B
	AT CTTTCAG AAAACTATAATTTT CTTG AAAA								<i>S. pneumionae</i> 23F
	AT CTTTCT GAAAACTATAATTTT CTTG AAAA								<i>S. mitis</i>
	AT CTTTCC GAAAACTATAATTTT CTTG AAAA								<i>S. sanguis</i>
	AT CTTTCC GAAAACTATAATTTT CTTG AAAA								<i>S. gordonii</i>
	AT CTTTCC GAAAACTGTAATTTT CTTG AAAGA								<i>S. thermophilus</i>
	AT CTTTCC GAAAACTATAATTTT CTTG AAACT								<i>S. suis</i> 89
	AT TTTTCC GAAAACTATAATTTT CTTG AAACT								<i>S. suis</i> P1
	AT CTTTCC GAAAACTATAATTTT CTTG AAAT								<i>S. mutans</i>
	TT CTTTCC GAAAACTGTAATTTT CTTG AAAA								<i>S. sobrinus</i>
	AT CTTTCC GAAAACTATAATTTT CTTG AAAA								<i>S. uberis</i>
	AT CTTTCC GAAAACTATAATTTT CTTG AAAA								<i>S. equi</i> subsp <i>equi</i>
	AT CTTTCT GAAAACTATAATTTT CTTG AAAA								<i>S. equi</i> subsp <i>zooepidemicus</i>
	AT CTTTCC GAAAACTGTAATTTT CTTG AAAA								<i>S. pyogenes</i> M3
	AT CTTTCC TAAAACTTTAATTTT CTTG AAAA								<i>S. pyogenes</i> M18
	AA CTTTCC GAAAACTATAATTTT CTTG AAAA								<i>S. pyogenes</i> M5
	AA CTTTCC GAAAACTATAATTTT CTTG AAAGT								<i>S. agalactiae</i>
	AT CTTTCC GAAAACTGTAATTTT CTTG CAAT								<i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i>
	AT CTTTCC GAAAACTGTAATTTT CTTG CAAT								<i>L. lactis</i> subsp <i>cremoris</i>
	★ ★★							★★★ ★	

Figure 40. 5pb différent entre le bras de fixation gauche et le droit.

A. Séquence des sites *difsL*, 2G, et 2D. Les bases mutées pour créer les sites 2D et 2G sont indiquées en rouge. La position des bases est également indiquée. **B.** Alignement des sites *difsL* chez plusieurs espèces de Streptocoques. Les bases conservées sont représentées en gras. Les 5 bases mutées pour les sites 2D et 2G sont indiquées en rouge. Les étoiles montrent les bases strictement conservées qui sont spécifiques du bras de fixation droit et du bras de fixation gauche.

avec une région centrale symétrique (HJS) (Figure 39C). Cette jonction de Holliday est résolue moins efficacement que celle portant le site sauvage. Il semble qu'on observe les deux produits de recombinaison, de 97pb et de 89pb, indiquant que XerS est capable de résoudre la jonction de Holliday dans les deux sens. Néanmoins, il apparaît que la préférence de brins échangés est inversée avec HJS, ce qui suggère fortement que la séquence de la région centrale est impliquée dans l'ordre d'échanges des brins. Lorsqu'on utilise un site symétrique, HJS2G, on a aboli complètement la résolution de la jonction de Holliday (Figure 39C).

Il est difficile de conclure quand aux résultats présentés ici de part le fait que la séquence de la région centrale n'a pas pu être définie. Notamment, il faut remarquer que la région centrale choisie fait 7pb (Figure 39C). Il est donc possible que la première base de cette région (A) fasse partie du bras de fixation gauche. Pour la même raison, je n'ai testé aucun autre type de jonction de Holliday pour approfondir cette étude de l'asymétrie du site. On peut simplement conclure que l'asymétrie de la région centrale comme celle des bras de fixation est nécessaire au contrôle de la directionnalité de la réaction de recombinaison.

2.3.3- L'asymétrie des bras de fixation du site *dif_{SL}* est attribuée à 5 paires de bases

La mutation de 5pb est suffisante pour changer le bras de fixation droit en la séquence du bras de fixation gauche, et inversement (Figure 40A). Les résultats obtenus précédemment démontrent donc l'importance de ces bases dans la reconnaissance du site et dans la réaction de recombinaison. Ces 5 pb sont situées aux positions 3,4,6,7,8 et 26,27,28,30 et 31, c'est à dire aux extrémités du site de recombinaison, ce qui correspond pour le site *dif* classique, aux positions les plus variables (Carnoy et Roten, 2009). J'ai donc décidé de regarder leur conservation chez différentes espèces de Streptocoques (Figure 40B). Sur le bras droit, 4 des 5 bases sont très conservées. Comme la cinquième base, C30, est remplacée par un A chez tous les Streptocoques analysés, et que c'est exactement cette mutation qui est faite pour le site symétrique, on peut en déduire que cette position ne semble pas importante. Il apparaît donc que les quatre bases T26, T27, G28 et A31 sont primordiales pour la résolution de la jonction de Holliday et confèrent une affinité moins importante de XerS sur la séquence. Pour le bras droit, seulement 3 bases sont strictement conservées, T4, T6, et C7. Néanmoins, très peu de variations sont retrouvées aux positions 3 et 8, ce qui ne nous permet pas de les exclure. Au vu de ces données, il n'est pas possible de conclure quant aux bases importantes pour la fixation de la recombinase et la résolution de l'intermédiaire réactionnel. Seule une

analyse par mutagenèse des 5 positions nous permettrait de démontrer l'importance de chacune d'entre elles dans la réaction de recombinaison.

2.4- Conclusion

Le site *dif_{SL}*, originellement décrit comme un séquence de 31pb, peut être considéré comme possédant une longueur de 33 ou 34pb, bien que la nature des bases additionnelles à droite du site n'apparaît pas importante. Ceci permet notamment de définir des bras de fixation de longueur identique, ce qui paraît plus cohérent pour un système impliquant une seule recombinaise à tyrosine. Bien que, de ce fait, on rende le site de recombinaison symétrique, il reste tout de même asymétrique lorsqu'on considère sa séquence nucléotidique. L'incapacité à définir les différentes parties qui constituent le site de recombinaison ne nous a pas permis d'approfondir l'étude de cette asymétrie. Néanmoins, nous avons montré qu'elle est indispensable à la résolution de l'intermédiaire réactionnel et donc à la productivité de la réaction de recombinaison. De plus, l'asymétrie au niveau des bras de fixation peut être attribuée à 5pb, qui confèrent une affinité différentielle de la recombinaise pour son site. Ces résultats suggèrent que l'assemblage sur le site de recombinaison est un point de contrôle important de la réaction de recombinaison.

III. Recherche des motifs orientant la translocation de FtsK_{SL}

1. Introduction

Les translocases à ADN et à ARN sont des protéines capables de se déplacer sur les molécules d'acide nucléique. Elles sont impliquées dans des processus cellulaires nombreux et variés (Singleton *et al.*, 2007). Pour que les protéines agissent de concert, il est important que la translocation se fasse dans une orientation définie. Pour les translocase simple brin, une fois qu'elles sont chargées sur la molécule d'acide nucléique, elles sont guidées par la polarité du brin. Pour les translocases double brins, il est proposé qu'elles reconnaissent un seul brin du duplex (Singleton *et al.*, 2007). De ce fait, le chargement sur le substrat devient l'étape cruciale qui dicte l'orientation de la translocation. Il a été mis en évidence pour la protéine FtsK d'*E. coli* que l'orientation de la translocation est dictée par des séquences de 8 pb, biaisées sur le chromosome, les KOPS. Le biais est défini par le nombre d'occurrences sur le brin continu par rapport au brin discontinu sur chacun des réplicores. Ainsi, on peut voir sur le chromosome d'*E. coli* que les KOPS, de séquence GGGNAGGG, sont biaisés suivant l'axe *oriC/dif* (Figure 41A). De cette manière, ils dirigent la translocase FtsK vers le site *dif* où elle active le mécanisme de recombinaison nécessaire à la résolution des dimères de chromosome. Ce mode d'orientation semble conservé chez les protéines de la famille FtsK puisque de tels motifs ont été mis en évidence chez *V. cholerae* (Val *et al.*, 2008) et chez *B. Subtilis* (Ptacin *et al.*, 2008). La protéine FtsK de *V. Cholerae* reconnaît le même motif que la protéine d'*E. coli*. De plus, ce motif est retrouvé chez un grand nombre de γ -protéobactéries parmi les motifs les plus biaisés et surreprésentés sur le génome (Hendrickson et Lawrence, 2006). Ces données suggèrent qu'en plus du mode d'orientation, la nature du motif est conservée. Chez *B. Subtilis*, qui appartient comme les Streptocoques au phylum des Firmicutes, le motif mis en évidence est différent, GAGAAGGG, et a été appelé SRS (*SpoIIIIE-Recognition Sequence*) (Ptacin *et al.*, 2008) (Figure 41B). De plus, les auteurs ont mis en évidence une spécificité de reconnaissance des motifs KOPS et SRS par les sous-domaines γ de FtsK et de SpoIIIIE. Cependant, les 6pb conservées sur 8 intègrent le motif SRS dans le motif consensus FRS (*FtsK-Recognition Sequence*), GNGNAGGG, qui avait été proposé en parallèle du KOPS (Levy *et al.*, 2005).

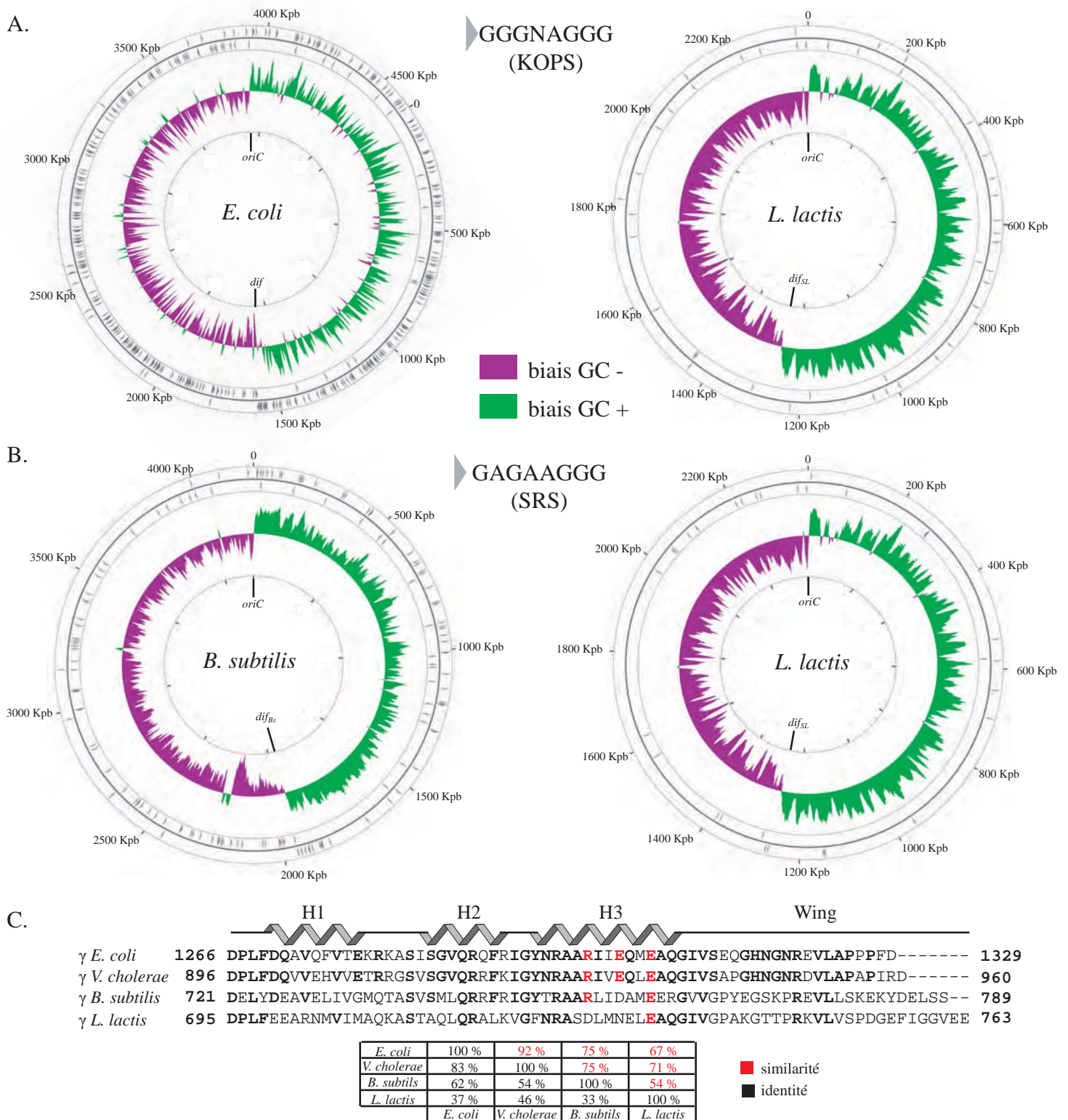


Figure 41. Les motifs KOPS et SRS sont peu représentés sur le génome de *L. lactis*.

Représentation de la distribution des motifs KOPS (A) et SRS (B) chez *E. coli* et *L. lactis* et *B. subtilis* et *L. lactis*, respectivement. Le biais de composition en bases GC ((C-G)/(C+G)) est indiqué en vert lorsqu'il est positif et en violet lorsqu'il est négatif. Les sites *oriC* et *dif*, *dif_{SL}* et *dif_{BS}*, de chacune des bactéries respectivement, sont positionnés sur le chromosome. Le génome d'*E. coli* représenté est celui de la souche K-12 MG1655 (NC_000913), pour *L. lactis* celui de la souche IL1403 (NC_002662) et pour *B. subtilis* celui de la souche 168 (NC_000964). La recherche des motifs a été effectuée grâce au logiciel fuzznuc (<http://mobyline.pasteur.fr>) et la représentation par le logiciel CGView (http://stothard.afns.ualberta.ca/public_html/). Les représentations sur les figures 44, 45, 46, 47 et 48 ont été réalisées de la même manière. C. Alignement des sous-domaine γ des protéines FtsK d'*E. coli*, de *V. cholerae*, de *L. lactis*, et de SpoIIIE de *B. subtilis*. Les acides aminés R1300, E1303 et E1306 de la protéine FtsK d'*E. coli*, importants pour la reconnaissance du motif KOPS, sont indiqués en rouge. Les AA conservés entre les protéines d'*E. coli* et de *V. cholerae* sont en gras. La structure secondaire de la protéine est indiquée au dessus. H : hélices. Le tableau indique les pourcentages d'identité (en noir) et de similarité (en rouge) de séquence pour les hélices H2 et H3 (logiciel SIAS, <http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>).

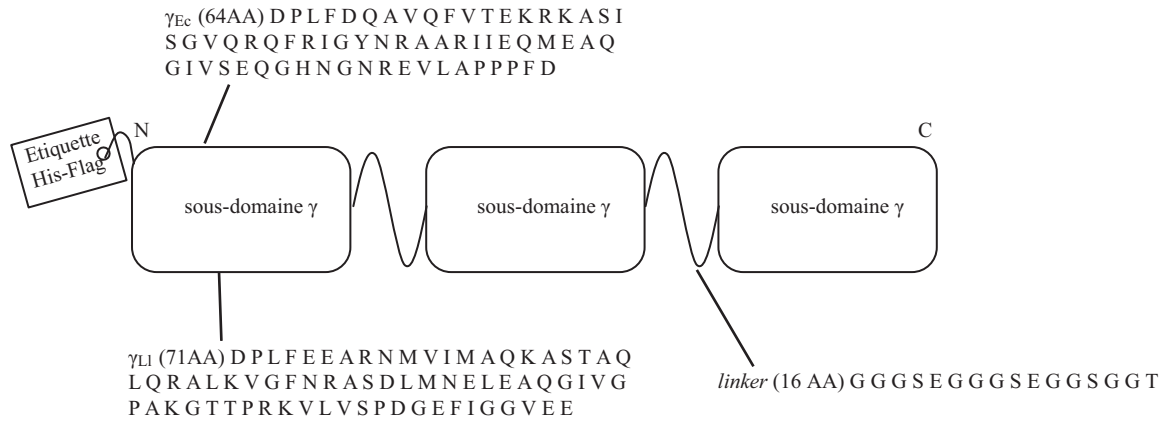
Toutes les données allant dans le sens d'une conservation du mode d'orientation de FtsK et possiblement du motif guidant la translocation, nous avons voulu définir le motif orientant la protéine FtsK de *L. lactis*. Il apparaît que, sur le génome de *L. lactis*, aucun des deux motifs, KOPS et SRS, ne présente les caractéristiques attendues pour orienter la translocation de FtsK (Figure 41A et B). En effet, ils sont peu présents et, de ce fait, n'apparaissent pas biaisés sur le chromosome. Ces données suggèrent fortement que chez *L. lactis*, s'il existe un motif orientant la translocase FtsK, il est différent des motifs décrits chez les autres espèces bactériennes. En accord avec ceci, les acides aminés montrés comme étant importants pour la reconnaissance des KOPS chez *E. coli*, R1300, E1303, et E1306 (Sivanathan *et al.*, 2009) ne sont pas conservés chez *L. lactis*, alors qu'ils le sont pour la protéine FtsK de *V. cholerae* (Figure 41C). Pour la protéine SpoIIIE de *B. subtilis* un seul acide aminé diffère, il pourrait rendre compte de la spécificité de reconnaissance entre le motif KOPS et le motif SRS. Sur la séquence de la protéine FtsK de *L. lactis*, un seul acide aminé est conservé. De plus, lorsqu'on étend cette analyse aux hélices H2 et H3, qui sont principalement impliquées dans l'interaction avec l'ADN (Löwe *et al.*, 2008), on remarque que les pourcentages de similarité de séquence les plus faibles sont obtenus avec la séquence de la protéine de *L. lactis* (Figure 41C). Toutes ces données vont dans le même sens, suggérant que le motif reconnu par FtsK de *L. lactis* est différent du KOPS ou du SRS. Afin de valider notre hypothèse et de déterminer le motif guidant la translocation de FtsK chez *L. Lactis*, nous avons utilisé une combinaison d'approches *in silico*, *in vitro* et *in vivo*.

2. Résultats

2.1- Utilisation d'une protéine chimérique

Pour définir le motif orientant la translocation de la protéine FtsK de *L. lactis*, nous avons décidé de comparer l'affinité du sous-domaine γ pour différentes séquences d'ADN. Cependant, il a été montré que le sous-domaine γ seul d'*E. coli* a une très faible affinité pour les KOPS (Sivanathan *et al.*, 2006). De plus, le co-cristal de γ avec un ADN portant un KOPS révèle qu'un motif est reconnu par trois sous-domaines γ (Löwe *et al.*, 2008). Nous avons alors décidé de construire une protéine chimérique constituée de trois sous-domaines γ , supposant qu'elle devrait être plus affine pour la séquence reconnue (Figure 42A). Pour cela, nous avons relié les sous-domaines par une séquence riche en glycine, qui devrait être flexible,

A.



B.

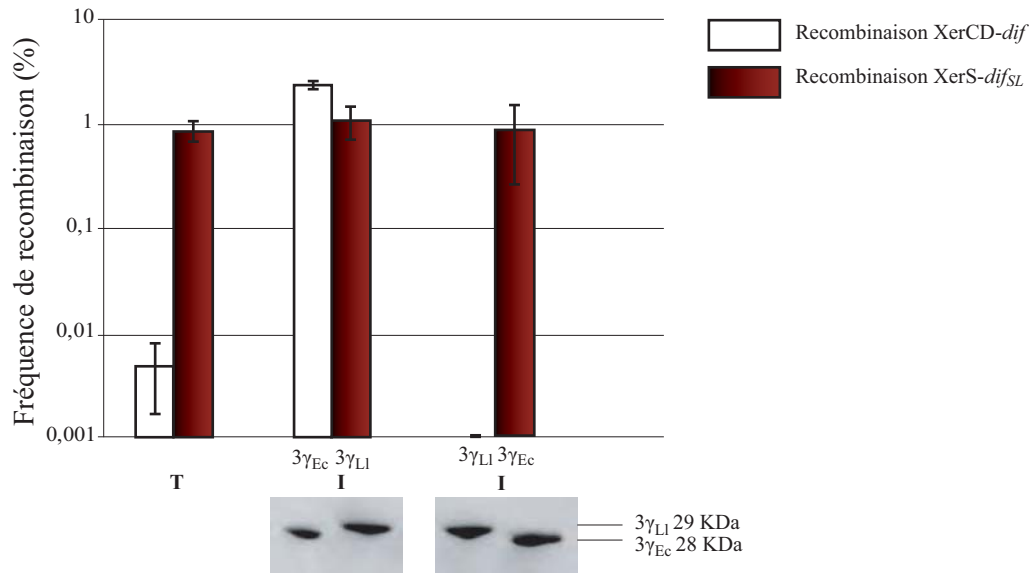


Figure 42. Utilisation d'une protéine chimérique 3 γ .

A. Représentation schématique d'un trimère de sous-domaine γ . La protéine contient trois sous-domaines γ , soit de FtsK d'*E. coli* (3 γ_{Ec}) soit de FtsK de *L. lactis* (3 γ_{Li}). La séquence en acides aminés des sous-domaines γ est indiquée au dessus du schéma pour *E. coli* et en dessous pour *L. lactis*. Les trois sous-domaines γ sont reliés par un « linker » de 16AA dont la séquence est indiquée. Les protéines 3 γ possèdent une étiquette His-Flag à leur extrémité N-terminale. **B.** Activation de la recombinaison Xer par la protéine 3 γ_{Ec} . Mesure de la fréquence de recombinaison à *dif* (en blanc) ou *dif_{SL}* (en rouge) dans une souche d'*E. coli ftsK Δ* γ transformée avec les plasmides exprimant XerC ou XerS, respectivement, et la protéine 3 γ_{Ec} ou 3 γ_{Li} comme indiqué. T : absence du plasmide exprimant les protéines 3 γ . I : Induction des gènes codant les protéines 3 γ par ajout de 0,1% d'arabinose. En dessous du graphique est montré un western blot réalisé grâce à un anticorps anti-Flag, indiquant que l'expression des deux protéines est identique.

n'imposant pas une structuration particulière à la protéine chimérique. La séquence « *linker* » choisie est celle qui a permis de créer des trimères du domaine C-terminal de la protéine FtsK d'*E. coli* (Crozat *et al.*, 2010).

Nous avons ainsi construit deux gènes, l'un codant la protéine $3\gamma_{LI}$ constituée des sous-domaines γ de *L. lactis* et l'autre codant la protéine $3\gamma_{Ec}$ composée des sous-domaines γ d'*E. coli*. Les protéines possèdent à leur extrémité amino-terminale une étiquette histidine utilisée lors de la purification par chromatographie d'affinité, ainsi qu'une étiquette Flag. La dernière étape de purification des deux protéines consiste en une colonne de gel filtration. Les protéines sortent en une seule fraction et à un temps indiquant qu'elles sont sous forme monomériques. Pour s'assurer que la conformation adoptée par la protéine chimérique ne gêne pas son activité, nous avons regardé *in vivo* l'activité du $3\gamma_{Ec}$ sur la recombinaison Xer. En effet, nous avons montré auparavant, qu'il est possible d'activer la recombinaison au site *dif*, dans une souche d'*E. coli* mutante *ftsKΔγ*, en exprimant le sous-domaine γ_{Ec} en *trans* (Nolivos *et al.*, 2010). Nous avons réalisé cette expérience en utilisant la protéine chimérique $3\gamma_{Ec}$ (Figure 42B). Les résultats obtenus montrent que la protéine $3\gamma_{Ec}$ active la recombinaison XerC/D-*dif*, mais pas la recombinaison XerS-*dif_{SL}*. Ce résultat est comparable à celui obtenu avec le sous-domaine γ_{Ec} seul (Nolivos *et al.*, 2010), indiquant que la conformation adoptée par la protéine chimérique maintient cette activité. Ce test ne nous permet pas de spéculer sur l'activité du $3\gamma_{LI}$ puisque, comme le sous-domaine γ_{LI} seul, il n'active ni la recombinaison à *dif*, ni la recombinaison à *dif_{SL}* (Figure 42B). Cependant, les résultats obtenus avec les protéines d'*E. coli* nous conforte dans l'idée que les domaines γ reliés en trimères par une séquence flexible ont conservés toutes leurs activités.

2.2- Les protéines 3γ d'*E. coli* se fixent efficacement sur des KOPS chevauchants

L'effet des KOPS sur la translocation de FtsK est cumulatif, c'est-à-dire qu'un motif a peu d'effet alors qu'une succession de KOPS a un effet important sur la translocation (Bigot *et al.*, 2005). Pour cette raison, nous avons tout d'abord regardé par des expériences de retards sur gel la fixation des protéines $3\gamma_{Ec}$ d'*E. coli* sur des ADN portant 3 KOPS chevauchants (Figure 43). En présence des protéines $3\gamma_{Ec}$ une grande partie de l'ADN est retardé, et on observe la formation d'un complexe nucléoprotéique C1. L'utilisation de protéines chimériques apparaît ainsi être un bon outil pour cette étude. Les expériences ont été réalisées en absence (-) et en présence (+) d'ADN compétiteur (polyIdC), ce qui ne change pas le

profil observé, démontrant que les complexes observés correspondent à des interactions spécifiques. Néanmoins, nous n'observons pas une seule bande nette, correspondant au complexe nucléoprotéique C1. Ceci nous indique que les complexes formés se dissocient dans le gel, apparaissant ainsi peu stables. L'instabilité des complexes est en accord avec le rôle biologique de cette interaction, puisqu'une interaction trop forte entre la protéine FtsK et l'ADN irait à l'encontre de son activité de translocation de l'ADN.

On remarque également que la protéine $3\gamma_{LI}$, à très forte concentration, forme un complexe (C2) en absence et en présence d'ADN compétiteur. Le complexe semble migrer à la même distance que celui formé par la protéine d'*E. coli*, ce qui suggère que la stoechiométrie des deux complexes est identique. Ce résultat nous indique donc que la protéine $3\gamma_{LI}$ reconnaît spécifiquement cet ADN et probablement le motif KOPS. Cependant, bien que le complexe formé semble stable, très peu d'ADN est retardé, démontrant que l'affinité de la protéine pour cette séquence est faible. Associé au fait que le motif GGGNAGGG n'est pas surreprésenté et peu biaisé sur le génome (Figure 41), ce résultat suggère que les KOPS d'*E. coli* ne sont pas de bons candidats pour orienter la translocation de FtsK de *L. lactis*.

2.3- La protéine 3γ de *L. lactis* ne reconnaît pas les AIMS

Le terme de AIMS (*Architecture IMparting Sequences*) définit des séquences, surreprésentées et biaisées suivant l'axe formé par les deux réplicores, qui maintiennent une structure polarisée du chromosome. Leur fonction n'est pas définie, mais la distribution biaisée de ces motifs sur le chromosome suggère qu'ils sont impliqués dans des processus biologiques qui utilisent la polarité de l'origine au terminus de réplication. Dans leur publication, les auteurs ont recherché les AIMS octamériques dont la fréquence augmente dans la région proche du terminus de réplication (Hendrickson et Lawrence, 2006). Ainsi, ils ont sélectionné des motifs potentiellement impliqués dans les processus de réplication et de ségrégation de l'ADN. Les critères utilisés coïncidant avec ceux des motifs orientant la translocation de FtsK, ils retrouvent chez *E. coli*, ainsi que chez de nombreuses protéobactéries, le motif KOPS. De plus, ils trouvent chez *B. subtilis* le motif SRS, qui oriente la translocation de la protéine SpoIIIE. Chez *L. lactis*, sur les quatre AIMS mis en évidence (Figure 44), aucun ne correspond aux KOPS ou aux SRS, en accord avec leur faible représentation sur le génome (Figure 41). Nous avons donc voulu vérifier si un de ces quatre motifs pouvait correspondre à la séquence orientant la protéine FtsK de *L. lactis*.

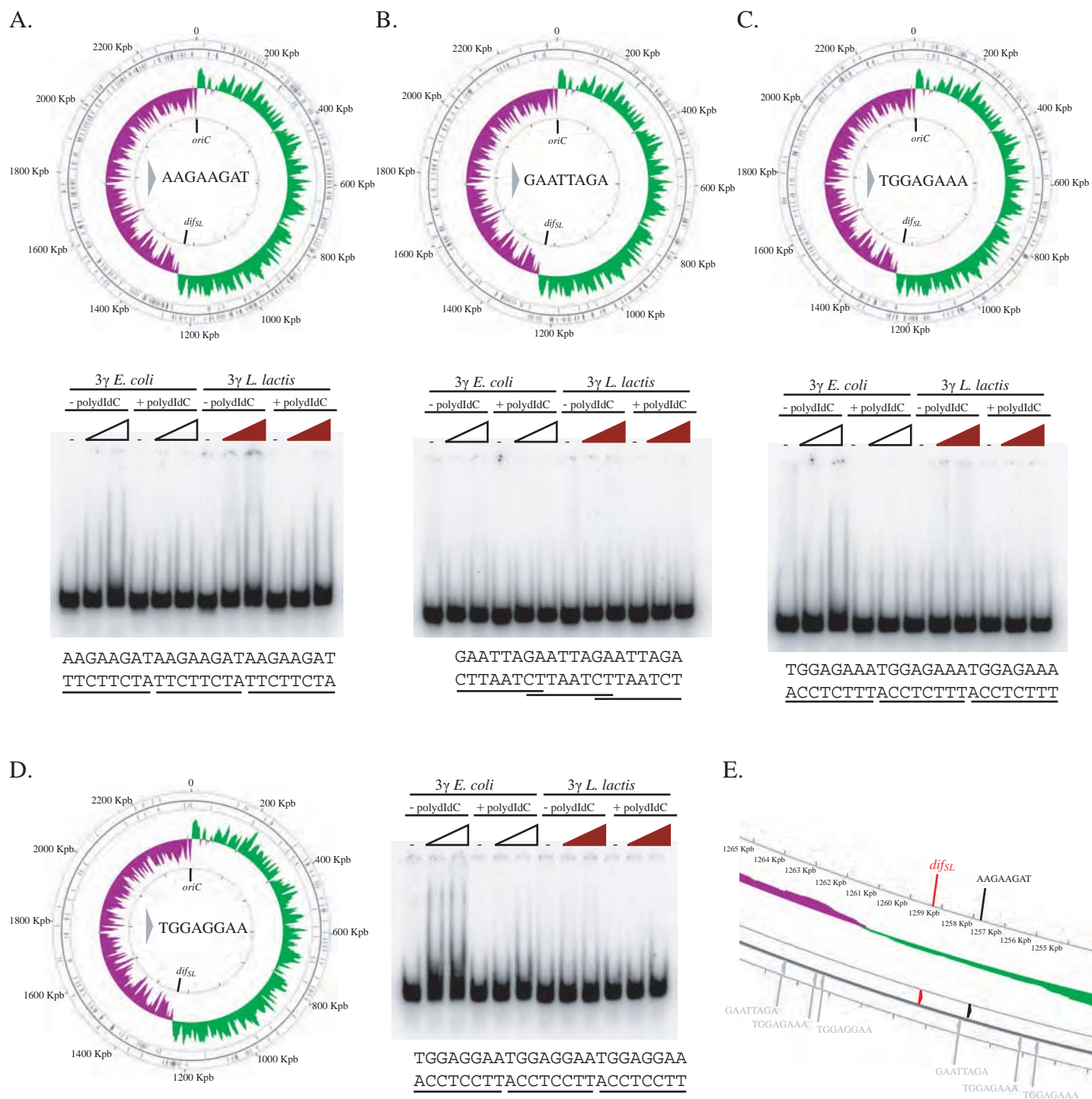


Figure 44. Les AIMS ne sont pas les motifs orientant la translocation de FtsK de *L. lactis*.

Représentation de la distribution des quatre AIMS sur le génome de la souche IL1403 de *L. lactis*. A chaque représentation est associée l'expérience de retards sur gel réalisée avec l'ADN portant trois fois le motif indiqué, AAGAAGAT (A), GAATTAGA (B), TGGAGAAA (C), et TGGAGGAA (D). E. Agrandissement de la région de 10Kb centrée sur *difSL* où les quatre motifs AIMS sont positionnés et indiqués.

Pour cela, nous avons testé la fixation des deux protéines 3γ sur des ADN portant une succession de trois motifs AIMS (Figure 44). Lorsqu'on regarde les profils obtenus en absence de polydIdC, on remarque que la fixation des protéines est dépendante de la séquence. Ainsi, le $3\gamma_{Ec}$ interagit avec les ADN portant les motifs AAGAAGAT (Figure 44A), TGGAGAAA (Figure 44C), et TGGAGGAA (Figure 44D), et le $3\gamma_{Ll}$ avec l'ADN AAGAAGAT (Figure 44A) et de manière très faible avec l'ADN TGGAGGAA (Figure 44D). Il apparaît donc que, même en absence d'ADN compétiteur, on peut détecter un faible niveau d'interactions spécifiques à l'ADN pour les protéines 3γ . La présence de polydIdC, au lieu de révéler la spécificité d'interaction, semble dissocier les complexes formés. Néanmoins, pour les quatre séquences testées, très peu d'ADN est retardé (Figure 44). Ces fixations apparaissent donc très faibles en comparaison de la fixation de la protéine $3\gamma_{Ec}$ sur un ADN constitué de 3 KOPS chevauchants (Figure 43). De plus, lorsqu'on s'intéresse à la représentation dans la région de 10Kb autour du site *dif_{SL}* des motifs AAGAAGAT et TGGAGGAA, reconnus par le $3\gamma_{Ll}$, on observe qu'ils sont présents une seule fois et dans l'orientation inverse de celle attendue pour diriger la protéine FtsK vers le site de recombinaison (Figure 44E). Au vu de ces résultats, il semble que chez *L. lactis* aucun des quatre motifs AIMS ne joue le rôle de KOPS.

2.4- Recherche de mots de 8 lettres biaisés et fréquents dans la région autour de *dif_{SL}*

Nous avons établi une collaboration avec Meriem El Karoui et Fabrice Touzain (INRA, Jouy-en-Josas) afin de rechercher les motifs de 8 lettres (pb) surreprésentés et biaisés sur le génome de *L. lactis* en imposant un seuil de fréquence et de biais dans la région autour du site *dif_{SL}*. Pour définir les bornes de cette région, nous nous sommes basés sur les données chez *E. coli*. En effet, le domaine d'activité de FtsK chez *E. coli* est d'environ 350Kb (Deghorain *et al.*, manuscrit en préparation), ce qui correspond à 7% du génome. Nous avons donc considéré chez *L. lactis* une région équivalente à 7% du génome, centré sur *dif_{SL}*. Les seuils de biais et de fréquence dans cette région ont été définis par rapport aux seuils minimaux retrouvés pour les KOPS chez *E. coli* et *V. cholerae* et pour les SRS chez *B. subtilis*.

L'analyse a été effectuée sur les génomes de deux sous espèces de *L. lactis* différentes, celui de la souche IL1403 de sous espèce *lactis* et celui de la souche MG1363 de sous espèce *cremoris* (Figure 45A). Cette étude nous a permis de mettre en évidence sur le génome de la souche MG1363 deux candidats, les motifs AGAAGAAG et AAGAAGAA. Sur le génome de

la souche IL1403 un seul des deux motifs se détache, AGAAGAAG. Pour vérifier l'affinité de la protéine $3\gamma_{LI}$ pour ces motifs, nous avons réalisé une expérience de retards sur gel en utilisant un ADN de taille équivalente à ceux utilisés précédemment, et portant une succession du trinuécléotide « GAA » (Figure 45B). Ainsi, on retrouve dans cet ADN « $(GAA)_n$ » à la fois le motif AGAAGAAG et le motif AAGAAGAA. En absence d'ADN compétiteur nous pouvons observer une faible quantité d'ADN retardé avec la protéine d'*E. coli*. Ce retard disparaît en présence de polydIdC démontrant que l'interaction observée du $3\gamma_{Ec}$ avec cet ADN est faible ou peu spécifique. En revanche, la protéine $3\gamma_{LI}$ se fixe spécifiquement et avec une forte affinité pour cette séquence puisque tout l'ADN est retardé. Un seul complexe est observé et il apparaît stable puisque nous n'observons pas de dissociation comme dans la figure 41. Le domaine γ de la protéine FtsK de *L. lactis* reconnaît donc un motif différent de celui d'*E. coli*, qui est contenu dans l'ADN « $(GAA)_n$ ».

2.5- Reconnaissance d'un seul motif par la protéine 3γ

Pour essayer de déterminer de manière plus précise le motif reconnu par la protéine $3\gamma_{LI}$ nous avons réalisé des expériences de retards sur gel en présence d'ADN contenant un seul motif, soit AGAAGAAG (Figure 46A), soit AAGAAGAA (Figure 46B). Il semble que la protéine $3\gamma_{Ec}$ se fixe sur l'ADN « AGAAGAAG » de manière très faible et uniquement en absence d'ADN compétiteur. La protéine $3\gamma_{LI}$ se fixe de manière spécifique puisque de l'ADN est retardé en absence et en présence de polydIdC. L'interaction observée est très faible puisque très peu d'ADN est retardé et que le complexe formé en absence d'ADN compétiteur semble se dissocier lorsque le polydIdC est ajouté. Néanmoins, le profil observé est similaire à celui correspondant à une interaction entre la protéine $3\gamma_{Ec}$ et un ADN contenant un seul KOPS (Figure 46C). On observe qu'en absence d'ADN compétiteur un complexe entre la protéine $3\gamma_{Ec}$ et l'ADN « KOPS » se forme, alors qu'en présence de polydIdC le complexe est dissocié. Ceci suggère fortement que la protéine $3\gamma_{LI}$ reconnaît spécifiquement le motif AGAAGAAG et qu'elle a une meilleure affinité pour ce motif que la protéine $3\gamma_{Ec}$ pour le KOPS (comparaison figure 46A et C). D'autre part, aucun complexe nucléoprotéique n'est formé avec l'ADN AAGAAGAA, ce qui indique qu'il n'est reconnu spécifiquement par aucune des deux protéines 3γ (Figure 46B). Ces résultats vont à l'encontre de la représentation de ces deux motifs dans la région de 10 Kb autour de *dif_{SL}* (Figure 46D). En effet, le motif AGAAGAAG reconnu par la protéine $3\gamma_{LI}$ n'est pas présent dans la région de *dif_{SL}*, alors que le motif AAGAAGAA, qui n'est pas reconnu par cette protéine, est

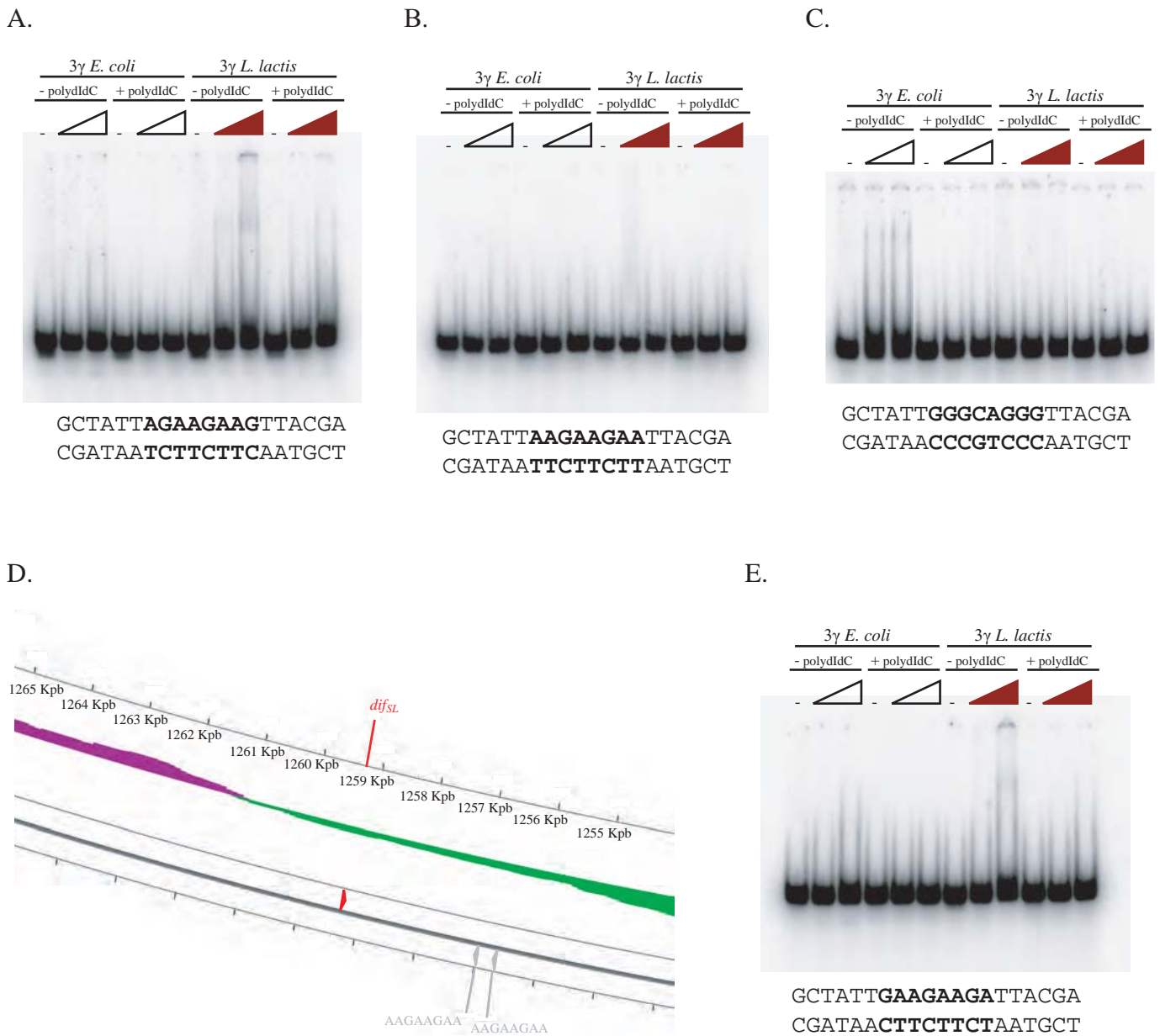


Figure 46. $3\gamma_{LI}$ reconnaît deux motifs absents de la région de 10Kb centrée sur *dif_{SL}*.

Comparaison de la fixation des protéines 3γ sur un ADN portant un seul motif, AGAAGAAG (A), AAGAAGAA (B) ou le KOPS (C). D. Agrandissement de la région de 10Kb autour de *dif_{SL}*. Seul le motif AAGAAGAA est présent alors qu'il n'est pas reconnu par la protéine $3\gamma_{LI}$ (B). E. $3\gamma_{LI}$ reconnaît spécifiquement le troisième octamère contenu dans l'ADN « (GAA)_n », GAAGAAGA.

retrouvé en deux copies à une distance d'environ 2Kb de *dif_{SL}* et dans l'orientation attendue, c'est-à-dire dirigé vers le site de recombinaison.

Pour valider ce résultat nous avons également testé un ADN portant le motif GAAGAAGA, qui est le troisième mot de 8 lettres contenu dans l'ADN « (GAA)_n » (Figure 46E). De manière surprenante, l'expérience de retards sur gel réalisée avec cet ADN présente le même profil que celle réalisée avec l'ADN contenant le motif AGAAGAAG. Ces résultats nous indiquent donc que la protéine 3 γ_{LI} reconnaît avec la même efficacité les deux motifs. De la même manière que pour le motif AGAAGAAG, la séquence GAAGAAGA n'est pas présente dans la région de 10Kb autour de *dif_{SL}* (Figure 46D). L'absence de ces deux motifs autour de *dif_{SL}*, associé au fait que la composition de ces motifs est similaire, nous a amené à rechercher un motif de 7 lettres.

2.6- Le domaine γ de *L. lactis* reconnaît un motif de 7 lettres

L'analyse bioinformatique décrite précédemment a été réalisée pour des motifs de 7 lettres. Le motif à la fois le plus biaisé et le plus surreprésenté est le motif GAAGAAG (Figure 47A). Ceci concorde très bien avec les résultats de retards sur gel obtenus précédemment puisque c'est le seul mot de 7 lettres contenu dans les deux ADN reconnus par le 3 γ_{LI} et absent de l'ADN qui n'est pas reconnu par la protéine (Figure 46B). Nous avons regardé la fixation du 3 γ_{LI} sur un ADN contenant ce motif de 7 lettres (Figure 47B). Le profil obtenu est similaire à celui des retards sur gel réalisés avec les motifs de 8 lettres. La protéine 3 γ_{LI} se fixe de la même manière sur le motif de 7 lettres que sur les deux motifs de 8 lettres. Ces résultats suggèrent donc fortement que le motif reconnu par la protéine FtsK de *L. lactis* est le mot de 7 lettres GAAGAAG.

L'affinité des protéines 3 γ pour un ADN contenant un seul motif étant faible, nous avons voulu confirmer ces résultats en utilisant un ADN contenant trois motifs séparés par 6pb (Figure 48). L'ADN contenant 3 KOPS est entièrement retardé par la protéine 3 γ_{Ec} en absence et en présence d'ADN compétiteur, ce qui démontre la forte affinité de la protéine pour cet ADN (Figure 48A). Le complexe formé en absence de polydIdC est en grande partie dissocié par la présence d'ADN compétiteur. La protéine 3 γ_{LI} , à forte concentration, forme un complexe mais très minoritaire. Ce résultat est en accord avec celui obtenu sur un ADN contenant 3 KOPS chevauchants (Figure 43), et indique fortement que le 3 γ de *L. lactis* reconnaît spécifiquement les KOPS d'*E. coli* mais avec une affinité très faible. Sur l'ADN contenant trois motifs GAAGAAG, la protéine 3 γ_{Ec} se fixe de manière peu stable (Figure

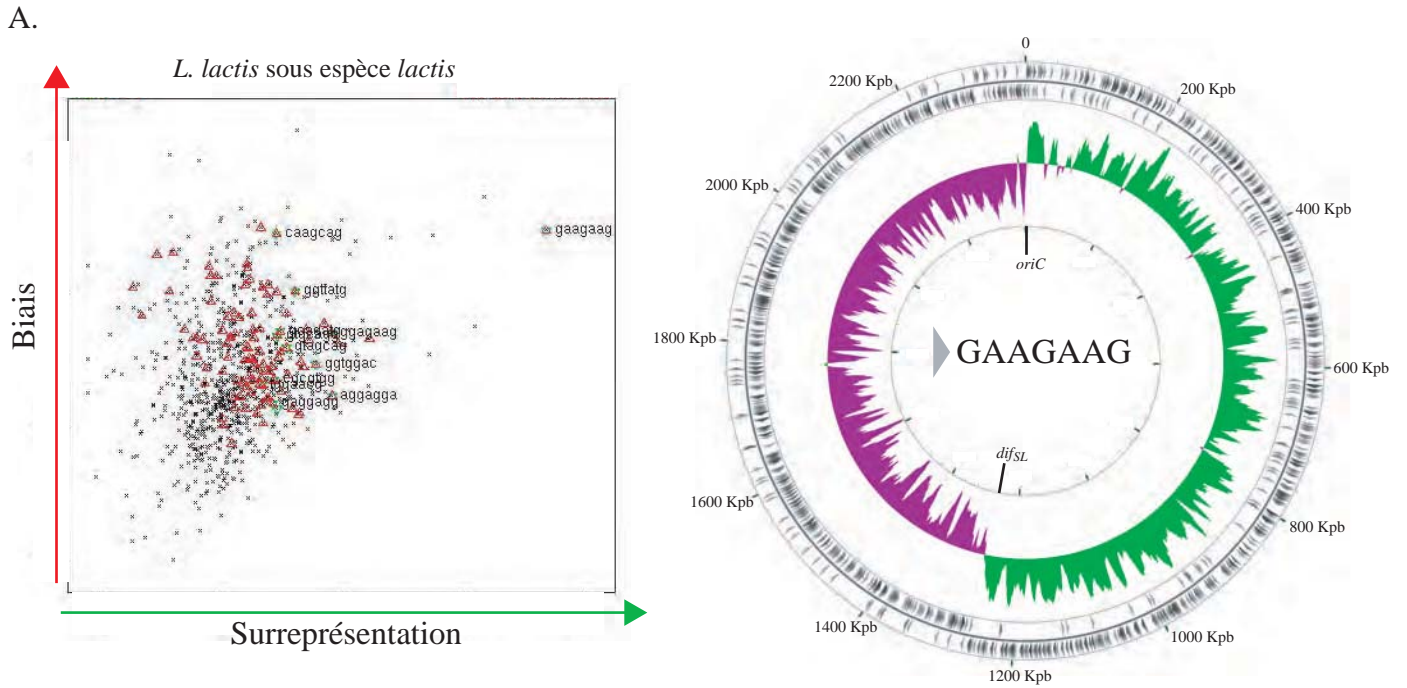


Figure 47. $3\gamma_{LI}$ reconnaît un motif de 7 lettres.

A. À gauche, représentations des motifs de 7 lettres biaisés et surreprésentés sur le génome de la souche IL1403, comme décrit figure 7. Un seul motif se « détache », GAAGAAG. A droite, distribution du motif GAAGAAG sur le génome de *L. lactis*. **B.** Expériences de retards sur gel utilisant un ADN portant le motif GAAGAAG. $3\gamma_{LI}$ reconnaît spécifiquement le mot de 7 lettres.

48B). En effet, de l'ADN est retardé et les complexes formés semblent être dissociés. En revanche, la protéine $3\gamma_{LI}$ retarde entièrement cet ADN et forme des complexes stables, même en présence d'ADN compétiteur pour la concentration en protéine la plus grande. Ces résultats confirment donc que le sous-domaine γ de la protéine FtsK de *L. lactis* reconnaît spécifiquement le motif GAAGAAG. De plus, la distribution de ce motif dans la région de 10 Kb centrée sur *dif_{SL}*, révèle qu'il est présent cinq fois, ce qui est comparable à la représentation du motif KOPS chez *E. coli*. On remarque également qu'un motif est dans l'orientation inverse de celle attendue pour diriger la recombinase vers le site *dif_{SL}*. Cependant, *in vivo*, l'effet d'un seul motif peut être moindre et de ce fait, ne pas gêner la translocation de FtsK jusqu'au site de recombinaison. Pour vérifier cette hypothèse et valider le motif GAAGAAG, nous voulons regarder l'effet de ce motif sur la translocation de FtsK *in vivo*.

2.7- Validation du motif par des test de translocation *in vivo*

Un des moyens indirect d'étude de l'activité des KOPS sur la translocation de FtsK *in vivo* est de placer sur le chromosome d'*E. coli* trois motifs en orientation non permissive à proximité du site *dif*. L'orientation des KOPS empêche FtsK d'arriver jusqu'au site de recombinaison, ce qui diminue considérablement la fréquence de recombinaison à *dif*. La comparaison de la fréquence de recombinaison à *dif* entre une souche sauvage et une souche possédant les KOPS en orientation non permissive permet d'évaluer l'impact de ces motifs sur la translocation de FtsK (Nolivos *et al.*, 2010). Nous voulons utiliser cette stratégie pour valider le motif GAAGAAG de *L. lactis*. Pour cela, nous construisons des souches d'*E. coli* *xerC*, où le site *dif* a été remplacé par une cassette *dif_{SL}-lacI-dif_{SL}*, en plaçant un motif ou trois motifs en orientation non permissive à 10pb de la cassette. Les souches utilisées possèdent également une protéine FtsK chimérique où le domaine C-terminal a été remplacé par celui de la protéine FtsK_{SL} de *L. lactis*. Les premiers résultats obtenus nous indiquent que la protéine chimérique reconnaît trois motifs KOPS. Ce résultat est en accord avec les interactions obtenues *in vitro* entre le $3\gamma_{LI}$ et trois motifs KOPS (Figures 43 et 48A). Cependant, nous n'avons pas encore testé l'effet d'un seul motif, et nous ne pouvons pas encore comparer les effets du KOPS à ceux du motif GAAGAAG.

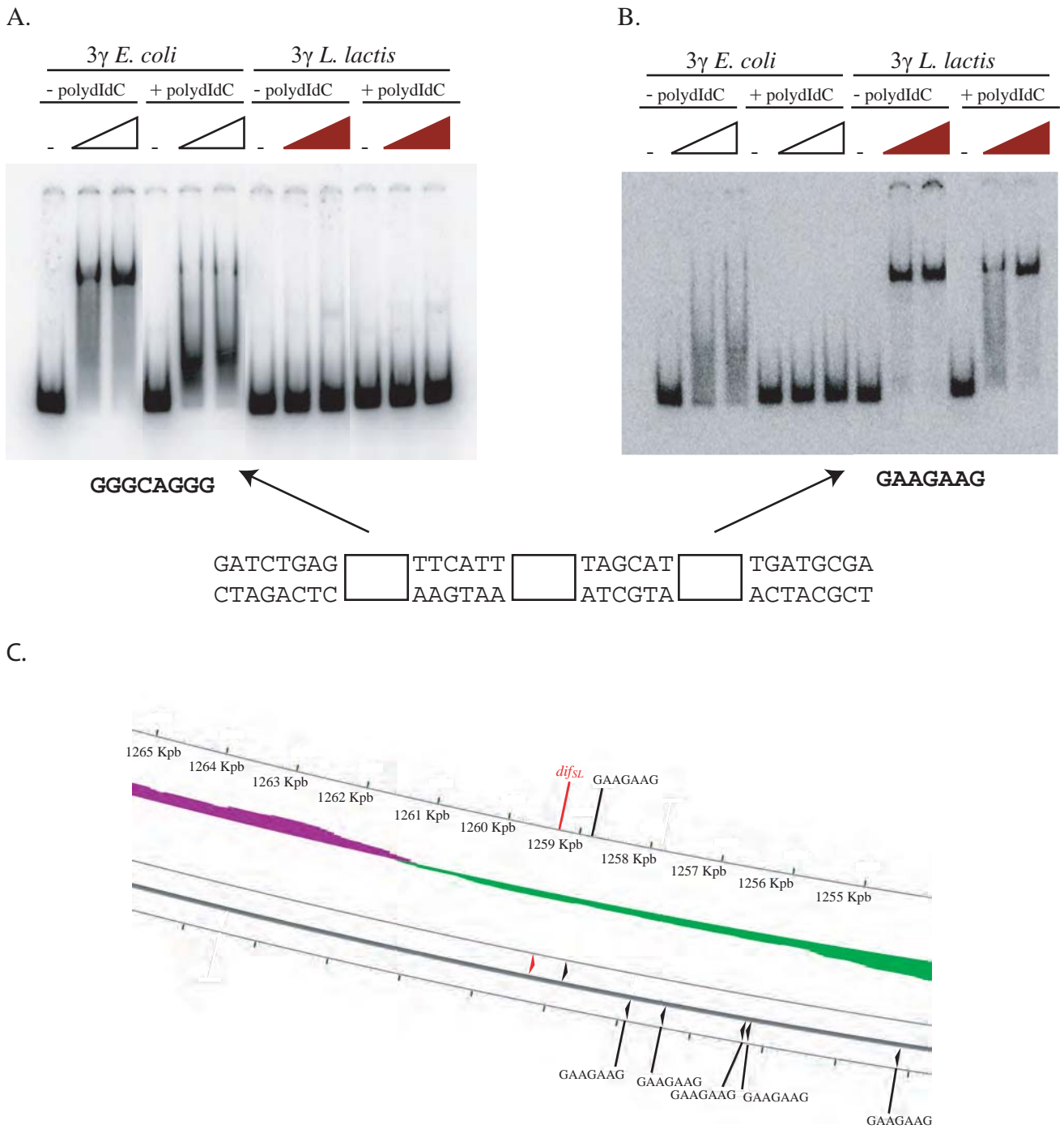


Figure 48. 3γ_{L1} reconnaît spécifiquement le motif GAAGAAG.

Expériences de retards sur gel en utilisant un ADN contenant 3 motifs KOPS (A) ou 3 motifs GAAGAAG (B), séparés par 6pb. La séquence de l'ADN est indiquée en dessous, les carrés blancs représentent soit le motif GGGCAGGG (A), soit le motif GAAGAAG (B). Les protéines 3γ_{Ec} et 3γ_{L1} reconnaissent spécifiquement et avec une forte affinité les motifs KOPS et GAAGAAG, respectivement. C. Distribution des motifs GAAGAAG dans la région de 10Kb centrée sur *dif_{SL}*. Le motif est présent en 5 copies, dont une en orientation inverse de celle attendue pour que FtsK atteigne le site de recombinaison.

3. Conclusions

Nous avons mis en évidence un motif reconnu par le sous-domaine γ de la protéine FtsK_{SL}, ce qui suggère fortement qu'il est impliqué dans l'orientation de la translocation de la protéine. Néanmoins, il est nécessaire de valider ce motif *in vivo* pour que cette étude permette de confirmer que l'orientation de la translocation par des motifs chromosomiques est conservée dans la famille FtsK/SpoIIIE. A l'inverse de ceux qui ont été décrits auparavant, la taille et la séquence du motif sont très différentes. En effet, le motif, GAAGAAG, fait 7pb et ne s'intègre pas dans le consensus GNGNAGGG. Il apparaît donc que bien que le mode d'orientation soit conservé, la nature du motif peut varier. Cependant, il est intéressant de noter que tous les motifs reconnus par le sous-domaine γ sont des polypurines, ce qui correspond aux motifs les plus surreprésentés sur les génomes bactériens, le motif le plus surreprésenté étant le motif AGAAGAAG (Davenport et Tümmler, 2010).

Il est assez surprenant que le motif mis en évidence possède une longueur de 7pb alors que les KOPS et SRS sont des séquences de 8pb. Cependant, ce résultat rappelle la découverte du site Chi chez *L. lactis* qui, de la même manière, fait 7pb alors que chez *E. coli* c'est un motif de 8pb (Biswas *et al.*, 1995) (El Karoui *et al.*, 2000). Mais la mise en évidence d'un motif de 7 lettres pose la question du mode de fixation du sous-domaine γ . S'il est similaire à celui d'*E.coli*, on pourrait s'attendre à la reconnaissance de triplet identiques pour les sous-unités A et C (Figure 26). Or, le motif est composé de manière à ce que les triplets aux deux extrémités soient différents, GAA et AAG. Si le sous-domaine γ reconnaît le triplet GAA on peut s'attendre à obtenir une meilleure fixation et ou stabilité sur un ADN contenant le motif de 9 lettres GAAGAAGAA. L'expérience de retard sur gel a été réalisée comme dans la figure 46 mais le résultat ne montre pas une affinité plus importante du $3\gamma_{LI}$ sur cet ADN.

L'utilisation d'une protéine chimérique apparaît être un bon outil pour étudier l'affinité du sous-domaine γ pour les KOPS, mais nous ne pouvons pas déterminer la stoechiométrie des complexes. Cependant, pour chaque expérience réalisée, nous observons un seul complexe et donc une seule forme d'interaction entre la protéine et l'ADN. Ceci peut laisser penser qu'un trimère reconnaît un seul motif. Des expériences de filtration sur gel pourraient permettre de préciser la nature des complexes. Si c'est effectivement le cas, il sera possible d'étudier les bases importantes pour la reconnaissance par la protéine 3γ , en réalisant des mutations sur les motifs KOPS, SRS, et GAAGAAG. Un ADN portant un seul motif est peu reconnu et donc ne permettra pas une telle étude, en revanche un ADN portant trois

motifs pourrait donner des réponses. De la même manière, l'utilisation de mutants du sous-domaine γ permettrait de définir les acides aminés important à la reconnaissance spécifique du motif.

III- DISCUSSION GENERALE

III- DISCUSSION GENERALE

I. Les systèmes Xer atypiques

1. *Un évènement apparu deux fois au cours de l'évolution.*

Lorsque j'ai commencé ma thèse, le système XerS/*dif_{SL}* des Streptocoques était le seul système Xer atypique à avoir été mis en évidence (Le Bourgeois *et al.*, 2007). Depuis, par une analyse bioinformatique, il a été découvert chez les epsilon-protéobactéries un système similaire. Il impliquerait une seule recombinase, XerH, qui reconnaîtrait un site de recombinaison particulier, *dif_H* (Carnoy et Roten, 2009). Jusqu'à présent il était admis que le système XerCD/*dif* était conservé dans le monde bactérien. Néanmoins, la recherche systématique d'homologues des recombinases XerC et XerD, et d'un site *dif* a principalement été effectuée chez les protéobactéries et les Firmicutes (Figure 29). En effet, ces deux phyla ne sont pas représentatifs de la diversité bactérienne, et chacun d'eux possède un sous-groupe utilisant un système de recombinaison différent. Il semble donc difficile de généraliser l'utilisation d'un système Xer « classique » à l'ensemble des bactéries. Ainsi, l'étude des systèmes Xer « atypiques » apparaît d'autant plus intéressante que l'on peut imaginer que ce ne sont pas les deux seuls présents dans le monde bactérien.

Il est intéressant de remarquer que les deux systèmes « atypiques » sont retrouvés dans un sous-groupe de deux phyla différents. Ceci, associé au fait que XerS et XerH sont phylogénétiquement aussi éloignées l'une de l'autre que des recombinases XerC et XerD (Carnoy et Roten, 2009), suggère que les deux systèmes sont apparus indépendamment. XerC et XerD partagent 37% d'identité de séquence, ce qui est important pour la famille des recombinase à tyrosine (Blakely *et al.*, 1993), et suggère que les gènes sont des paralogues. Il y aurait donc eu duplication de gènes très tôt, puis perte d'une des deux recombinases du système deux fois au cours de l'évolution. Une autre possibilité est que le système Xer « classique » ait été perdu et remplacé par l'acquisition d'un système « atypique » complet. Plus en accord avec cette deuxième possibilité, les deux systèmes « atypiques » se présentent sous la forme d'un module génétique (Le Bourgeois *et al.*, 2007 ; Carnoy et Roten, 2009). De plus, les sites de recombinaison sont conservés (Figure 31). Notamment, les sites *dif_{SL}* et *dif_H* possèdent une similarité de séquence au niveau des bases formant les séquences inversées

répétées de part et d'autre de la région cœur. D'autre part, l'organisation des sites est similaire puisque dans les deux cas, les deux bras de fixation de la recombinase sont constitués de séquences différentes. Il semble donc qu'une telle organisation des sites soit importante pour les mécanismes de résolution de dimères de chromosome impliquant une seule recombinase.

2. Un site de recombinaison original.

Le site *dif_{SL}* est particulier puisqu'il est différent en taille et en séquence des sites *dif* « classiques ». Il a été défini comme possédant une longueur de 31pb (Le Bourgeois *et al.*, 2007), mais nous avons vu que, *in vitro*, la fixation de XerS nécessite quelques paires de bases supplémentaires à droite du site. De ce fait, le site possède deux bras de fixation de XerS de longueurs identiques et une longueur totale de 33 ou 34pb. Toutefois, le site *dif_{SL}* reste original puisqu'il est asymétrique au niveau de sa séquence nucléotidique. En effet, cette caractéristique n'est pas commune pour les systèmes de recombinaison impliquant une seule recombinase.

Nous avons montré que la séquence du site impose un ordre d'assemblage de XerS sur l'ADN, un monomère se fixant d'abord sur le bras de fixation gauche, puis de manière coopérative le deuxième monomère se fixe sur le bras de fixation droit. Nous avons également montré que l'asymétrie est nécessaire à la réaction de recombinaison. En effet, XerS montre peu ou pas d'activité de résolution d'une jonction de Holliday contenant un site de recombinaison possédant les deux bras de fixation identiques (deux bras gauche). En revanche, sur le site *dif_{SL}* sauvage, XerS résout la jonction de Holliday dans les deux sens, et préférentiellement par échange des brins inférieurs. On retrouve donc une asymétrie au niveau de la fixation au site de recombinaison ainsi qu'au niveau de la résolution de l'intermédiaire de la réaction de recombinaison. Ces deux niveaux d'asymétrie sont retrouvés pour le système XerCD/*dif* d'*E. coli*. On peut alors supposer que l'asymétrie apportée par la présence de deux recombinases différentes pour les systèmes Xer « classiques » est compensée pour les systèmes Xer « atypiques » par la séquence du site de recombinaison.

3. La réaction de recombinaison.

Nous n'avons pas réussi à obtenir *in vitro* une réaction de recombinaison complète, nous ne pouvons donc pas définir précisément le déroulement de la réaction de recombinaison catalysée par XerS. Néanmoins, nous pouvons spéculer à partir des résultats obtenus avec la jonction de Holliday synthétique et par comparaison avec les systèmes déjà décrits. Nous avons vu que la jonction de Holliday est résolue par XerS dans les deux sens, et préférentiellement par l'échange des brins inférieurs. Ce résultat indique que si la poche catalytique est formée par un seul monomère de XerS, et donc que la coupure est catalysée en « *cis* » (ce qui est le mode de coupure le plus courant), ce sont les monomères fixés sur les bras droits des sites qui réalisent préférentiellement la coupure et l'échange de brins. Nous ne pouvons pas conclure de ce résultat si la résolution préférentielle de la jonction de Holliday mène à la formation des produits ou des substrats, et donc si elle correspond au deuxième ou au premier échange de brins de la réaction de recombinaison. Cependant, pour le système Xer d'*E.coli*, une jonction de Holliday synthétique contenant le site *dif* est résolue, *in vitro*, par XerC (Arciszewska et Sherratt, 1995), ce qui correspond au deuxième échange de brins. Pour le système *Cre/loxP*, le profil de résolution d'une jonction de Holliday synthétique est similaire à celui obtenu avec *XerS/dif_{SL}* (Lee et Sadowski, 2001). De plus, la résolution préférentielle du substrat par la recombinase *Cre* correspondrait à la deuxième réaction de coupure et d'échange de brins (Ghosh *et al.*, 2005). Il est donc possible que pour le système *XerS/dif_{SL}* la résolution préférentielle de la jonction de Holliday corresponde à la deuxième réaction de coupure et d'échange de brins. La réaction se déroulerait alors par la coupure et l'échange de brins supérieurs par les recombinases positionnées sur les bras de fixation gauches. La jonction de Holliday ainsi formée serait par la suite résolue par les monomères fixés sur les bras de fixation droits. Le mécanisme de recombinaison pourrait alors être généralisable, c'est-à-dire que le monomère ayant la plus forte affinité pour son bras de fixation, et donc certainement le premier monomère fixé sur le site, assurerait la première réaction de coupure et d'échange de brins. En effet, c'est le cas pour le système *XerCD/dif* d'*E. coli* (Blakely et Sherratt, 1996a) ou le système *Cre/loxP* du bactériophage P1 (Lee *et al.*, 2003).

II. Le contrôle de la résolution des dimères de chromosome par la translocase FtsK

1. Le contrôle du système XerS/*dif_{SL}*.

Nous avons montré que, bien que les systèmes Xer « classiques » et « atypiques » possèdent des machineries de recombinaison différentes, le contrôle par la protéine FtsK est conservé. Il est nécessaire que FtsK soit localisée au septum de division pour résoudre les dimères de chromosomes en monomères. En effet, lorsque le domaine C-terminal est exprimé indépendamment du domaine N-terminal, il est capable d'activer la réaction de recombinaison par XerS au site *dif_{SL}*, mais pas de résoudre les dimères de chromosomes. D'autre part, FtsK doit arriver au site *dif_{SL}*, probablement pour favoriser la formation de la synapse de recombinaison et/ou activer la réaction de recombinaison.

Cependant, un point important qui diffère du système Xer « classique » est que pour le système Xer de *L. lactis*, si il y a une d'activation par le sous-domaine γ de FtsK, elle est différente de celle décrite chez *E. coli*. Le système Xer d'*E. coli* implique deux protéines différentes. De ce fait, chaque réaction de coupure et d'échange de brins est sous la dépendance d'une recombinase différente. L'activation de XerD par le sous-domaine γ permet alors le contrôle d'une seule réaction de coupure et d'échange de brins. Le fait que le système XerS/*dif_{SL}* n'utilise pas un tel contrôle de la réaction de recombinaison pourrait être en accord avec l'implication d'une seule recombinase. En effet, il est plus difficile d'imaginer une spécificité de reconnaissance de l'un ou l'autre des deux monomères lorsque ce sont les même. Néanmoins, on ne peut pas exclure qu'il n'y ait pas un contrôle similaire chez *L. lactis*. Il pourrait être apporté, par exemple, par un autre sous-domaine de la protéine FtsK. En effet, FtsK est bloquée spécifiquement par les complexes XerCD/*dif* ou Cre/*loxP* (Graham *et al.*, 2010), et donc probablement par le complexe XerS/*dif_{SL}*. De plus, ce blocage est indépendant de la présence du sous-domaine γ , suggérant une interaction possible entre XerD et le sous-domaine β et donc possiblement entre XerS et β . Toutefois, si il y a bien une activation de XerS, comme l'activation de XerD proposée, et donc que cette activation contrôle une seule réaction de coupure et d'échange de brins, il semble nécessaire qu'il y ait une spécificité de reconnaissance d'un seul des deux monomères fixés sur le site de recombinaison.

Par ailleurs, le niveau basal de recombinaison $XerS/dif_{SL}$ en absence de $FtsK_C$ est de 1%. Ce niveau de recombinaison est considérable lorsqu'on le compare au niveau basal du système $XerCD/dif$ qui est de l'ordre de 0,01%. Ce résultat pourrait également aller dans le sens d'une absence d'activation de $XerS$ par le sous-domaine γ de $FtsK$. En effet, on peut imaginer que, à l'inverse de $XerD$, $XerS$ est toujours active. Le facteur limitant serait alors la formation d'un complexe synaptique dans la conformation favorable à la première coupure. Un tel complexe synaptique se formerait donc dans 1% des cas.

2. L'activation du système $XerCD/dif$ par le sous-domaine γ de $FtsK$.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, $FtsK$ contrôlerait le système $XerCD/dif$ en favorisant la formation de la synapse de recombinaison, par son activité de translocase à ADN, et en activant la réaction de recombinaison. L'activation de la réaction de recombinaison consisterait en deux choses. Tout d'abord, il faudrait amener le complexe synaptique formé dans la conformation favorable à la première coupure par $XerD$. Ensuite, il est proposé qu'il y ait une activation de la recombinase $XerD$ qui la rendrait « catalytiquement active », suggéré notamment par un repositionnement correct de la tyrosine catalytique. Il a été mis en évidence une interaction entre le sous domaine γ de $FtsK$ et la recombinase $XerD$. Cette interaction pourrait être impliquée à la fois dans le remodelage du complexe synaptique et dans l'activation de la recombinase $XerD$. D'un autre côté, il est possible que l'interaction $\gamma/XerD$ soit seulement impliquée dans l'activation de la recombinase. Dans ce cas, le changement de conformation du complexe synaptique nécessiterait une activation additionnelle. En accord avec ces deux hypothèses, il a été mis en évidence l'importance des bases adjacentes au site *dif* (Bonné *et al.*, 2009). Les auteurs proposent que le positionnement de $FtsK$ sur l'ADN pourrait stabiliser l'interaction $\gamma/XerD$ et/ou jouer un rôle dans le remodelage du complexe de recombinaison.

Nous avons montré dans la partie résultats que le sous-domaine γ seul peut activer la recombinaison à *dif* indépendamment de la présence du domaine C-terminal de $FtsK$ *in vivo*. Ce résultat est en accord avec le fait que le sous-domaine γ seul est capable d'activer la coupure par $XerD$ *in vitro* (Yates *et al.*, 2006), et qu'une protéine de fusion $\gamma/XerD$ est active indépendamment de la présence de $FtsK$ (I Grainge, communication personnelle). Ces différentes données vont dans le sens de la première proposition, c'est-à-dire que l'interaction

γ /XerD serait suffisante pour activer la réaction de recombinaison. Il y aurait donc activation de la recombinase et changement conformationnel du complexe de recombinaison. Néanmoins, la fréquence de recombinaison obtenue *in vivo* est de seulement 1%. En supposant que dans ces conditions on soit saturant en sous-domaine γ et que, de ce fait on « active » toutes les recombinases XerD, on retrouve les mêmes fréquences de recombinaison que celles obtenues avec le système XerS/*dif_{SL}* en absence de FtsK. Comme proposé pour le système Xer de *L. lactis*, la fréquence de recombinaison obtenue, en produisant le sous-domaine γ indépendamment du reste de la protéine, pourrait correspondre à la formation aléatoire d'un complexe synaptique dans la conformation favorable à la coupure par XerD. Dans ce cas, il est plus raisonnable de penser que l'interaction γ /XerD « activerait » la recombinase, mais ne permettrait pas de modifier le complexe de recombinaison. Ceci suggère donc que le moteur de translocation est nécessaire, pour favoriser la formation du complexe synaptique et/ou assurer le changement conformationnel qui permettrait la première coupure par XerD.

3. Importance de l'activation par le sous-domaine γ de FtsK.

Un autre point important qui ressort des résultats présentés précédemment, est que le domaine C-terminal de FtsK_{SL} de *L. lactis* active la recombinaison XerCD/*dif*. En effet, lorsqu'on remplace de domaine C-terminal de FtsK par celui de FtsK_{SL} de *L. lactis*, la fréquence de recombinaison est identique à celle obtenue avec la protéine sauvage. En revanche, le sous-domaine γ seul de *L. lactis* n'active pas la recombinaison Xer d'*E. coli in vivo*. Il est donc intéressant de remarquer que l'absence d'activation par le sous-domaine γ peut être « compensée » *in vivo*. Ce résultat soulève donc la problématique de l'importance de l'activation de la recombinaison XerCD/*dif* par le sous-domaine γ de FtsK. En effet, au vu de ces données, il semblerait que cette activation ne soit pas indispensable au bon déroulement de la réaction de recombinaison. Ce résultat remet également en cause l'importance et la spécificité de l'interaction γ -XerD, et plus particulièrement les acides aminés montrés comme étant impliqués dans cette interaction (Yates *et al.*, 2006), puisqu'ils ne sont pas conservés sur la protéine FtsK_{SL} (Figure 41).

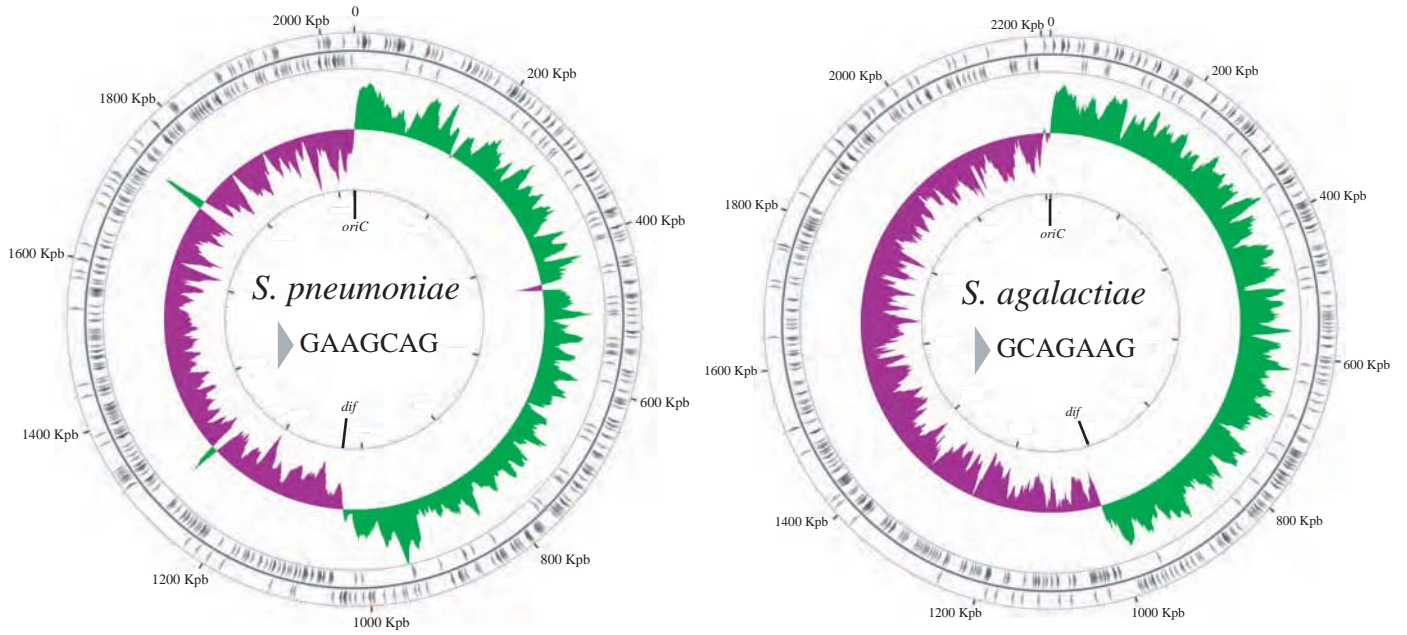
D'autre part, comme nous l'avons vu précédemment, il n'y a pas d'activation du système Xer de *L. lactis* par le sous-domaine γ de FtsK de *L. lactis* ni d'*E. coli*, ce qui pourrait

rendre compte du niveau basal élevé de recombinaison XerS/*dif_{SL}* en absence de FtsK. Il semblerait alors que l'activation par le sous-domaine γ chez *E. coli* soit un niveau de contrôle supplémentaire qui empêcherait toute recombinaison tant que FtsK n'est pas arrivée au site de recombinaison. Pourquoi un tel contrôle n'est pas conservé chez *L. lactis* ou pourquoi un tel contrôle est présent chez *E. coli*? Est ce que la fréquence de formation de la synapse de recombinaison productive est plus importante chez *E. coli*? Est-ce que des événements de recombinaison se produisant alors que FtsK n'est pas arrivée au site *dif* sont plus délétère pour *E. coli* que pour *L. lactis*? Pour l'instant, aucun élément ne permet de répondre à ces différentes interrogations.

4. Implications de FtsK dans la formation de la synapse de recombinaison.

Chez *E. coli*, que ce soit avec le système XerS/*dif_{SL}* ou le système XerCD/*dif*, nous venons de voir que, en absence de FtsK, une synapse productive se formerait dans 1% des cas. En considérant que la formation du complexe de recombinaison nécessite FtsK pour rapprocher les sites et pour remodeler le complexe de recombinaison, cette fréquence peut apparaître importante. En effet, comme il semble fort probable que le complexe formé prenne la conformation préférentielle à la seconde coupure, ceci suggérerait qu'un complexe synaptique se formerait de manière aléatoire dans plus de 1% des cas. De ce fait, il peut sembler que FtsK ne soit pas indispensable pour rapprocher les sites de recombinaison. En accord avec cela, il a été montré *in vivo*, en absence de FtsK, que des jonctions de Holliday sont formées après coupure et échange de brins catalysées par XerC (Barre *et al.*, 2000). D'autre part, plusieurs études montrent que la région de terminaison de la réplication serait cohésive (Li *et al.*, 2003 ; Bates et Kleckner, 2005 ; Reyes-Lamothe *et al.*, 2008 ; Mercier *et al.*, 2008 ; Adachi *et al.*, 2008). En effet, il est proposé qu'une fois répliquées, les régions de terminaison de la réplication restent proches l'une de l'autre, durant un certains temps. Cette période de cohésion serait probablement nécessaire pour résoudre les différents liens qui peuvent unir les chromosomes frères, et/ou au couplage de la ségrégation des chromosomes avec la division cellulaire. Il est donc fortement possible que cette période de cohésion puisse favoriser la formation de la synapse de recombinaison.

A.



B.

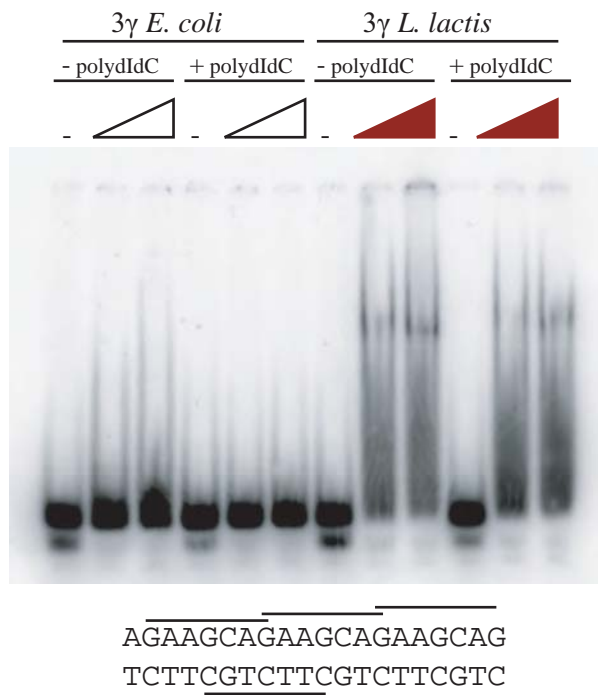


Figure 49. $3\gamma_{LI}$ tolère un C à la deuxième et/ou cinquième position du motif GAAGAAG.

A. Distribution du motif GAAGCAG sur le génome de la souche R6 (NC_003098) de *S. pneumoniae* (à gauche) et du motif GCAGAAG sur le génome de la souche NEM316 (NC_004368) de *S. agalactiae* (à droite). La représentation a été effectuée comme décrit figure 41. **B.** Expériences de retards sur gel utilisant un ADN portant une succession du motif GAAGCAG ou GCAGAAG. $3\gamma_{LI}$ reconnaît spécifiquement le(s) mot(s) de 7 lettres GAAGCAG et/ou GCAGAAG.

III. Les protéines de la famille FtsK/SpoIIIE sont orientées par des motifs chromosomiques

1. La protéine FtsK_{SL} reconnaît un motif de 7pb.

Nous avons démontré que le sous-domaine γ de la protéine FtsK_{SL} de *L. lactis* reconnaît la séquence de 7pb GAAGAAG. Ce motif est surreprésenté et biaisé suivant l'axe *oriC/dif_{SL}* sur le chromosome de *L. lactis*, suggérant fortement qu'il est impliqué dans l'orientation de la translocation de FtsK_{SL}. Il est à présent nécessaire de le valider *in vivo* pour confirmer qu'il joue le rôle de KOPS ou de SRS. L'originalité du motif mis en évidence chez *L. lactis* provient de sa taille et de sa séquence. En effet, il ne s'intègre pas dans le motif consensus FRS, GNGNAGGG, qui a été proposé (Levy *et al.*, 2005). Il semble donc que l'orientation par des motifs chromosomiques soit une caractéristique conservée de la famille FtsK/SpoIIIE, en revanche, la nature du motif peut varier.

L'analyse bioinformatique qui nous a permis de rechercher les motifs potentiellement impliqués dans l'orientation de la translocation de FtsK_{SL} de *L. lactis*, a également été effectuée pour deux autres espèces de Streptocoques. Ainsi, elle propose le motif GAAGCAG pour *S. pneumoniae* et le motif GCAGAAG pour *S. agalactiae* (Figure 49A). Cependant, ces deux motifs n'ont pas été testés expérimentalement. D'autre part, j'ai testé par des expériences de retards sur gels la fixation de la protéine $3\gamma_{LI}$ sur un ADN portant une succession de la séquence GAAGCAG ou GCAGAAG (Figure 49B). Le profil obtenu montre que tout l'ADN est retardé. L'interaction observée apparaît un peu moins stable qu'avec l'ADN (GAA)_n (Figure 45), puisque le complexe formé semble se dissocier dans le gel. Néanmoins, le résultat obtenu indique que le motif GAAGCAG et/ou le motif GCAGAAG est reconnu spécifiquement par la protéine $3\gamma_{LI}$. Bien que ces différentes données soient préliminaires, elles vont dans le même sens, et permettent de suggérer le motif consensus GNAGNAG comme séquence potentiellement impliquée dans l'orientation de la translocation de FtsK_{SL} chez les Streptocoques.

2. Les protéines de la famille FtsK/SpoIIIE reconnaissent des polypurines.

Il est intéressant de remarquer que tous les motifs mis en évidence jusqu'à présent GNGNAGGG ou GAAGAAG sont des polypurines. D'autre part, le motif GAAGAAG fait partie de la séquence AGAAGAAG, qui correspond au motif le plus surreprésenté dans le monde bactérien (Davenport et Tümmler, 2010). Ce motif est surreprésenté sur le génome d'*E. coli* mais il n'est pas biaisé. Les résultats de retards sur gel obtenus montrent que la protéine $3\gamma_{Ec}$ ne reconnaît pas spécifiquement la séquence GAAGAAG (Figure 48), en accord avec la représentation de ce motif sur le génome d'*E. coli*. Il y a donc eu une évolution pour conserver ce mode d'orientation de la translocase FtsK, mais pas le motif reconnu. Sur un arbre phylogénétique, les Streptocoques apparaissent tôt et les gamma-protéobactéries font partie des familles de bactéries les plus récemment apparues (Wu *et al.*, 2009), suggérant le sens de l'évolution du système. Néanmoins, *B. subtilis* appartient comme les Streptocoques au phylum des Firmicutes, et la protéine SpoIIIE reconnaît un motif proche du KOPS d'*E. coli*. On souligne alors peut être ici une autre particularité de la famille des Streptocoques.

D'autre part, la mise en évidence d'un motif de 7pb chez *L. lactis* repose le problème du mode de reconnaissance des motifs chromosomiques par le sous-domaine γ de FtsK. En effet, le mode de fixation proposé d'après la structure du sous-domaine γ de *P. aeruginosa* complexé à un KOPS (Löwe *et al.*, 2008), ne semble pas s'appliquer à la reconnaissance du motif GAAGAAG. Les auteurs proposent que les sous-unités A et C reconnaissent le même triplet de bases « GGG » (Figure 26). Dans le cas du motif mis en évidence chez *L. lactis*, les deux sous-unités reconnaîtraient un triplet différent, mais il semble peu probable que les modes de reconnaissance diffèrent entre les différentes protéines de la famille FtsK/SpoIIIE. Il est possible que les sous-unités A et C reconnaissent spécifiquement les triplets de bases « GAA » ou « AAG ». Dans ce cas la sous-unité B ne ferait aucun contact avec l'ADN et pourrait peut être permettre de stabiliser les sous-unités A et C. La découverte d'un motif différent chez *L. lactis* pourra sûrement permettre de mieux comprendre la spécificité de reconnaissance de séquence d'ADN particulières par le sous-domaine γ de FtsK. Notamment, il sera possible d'étudier précisément les acides aminés impliqués dans la reconnaissance des motifs chromosomiques par mutagénèse des protéines 3γ , ou encore les bases spécifiquement reconnues par l'utilisation de séquences d'ADN différentes.

IV- MATERIEL ET METHODES

IV- MATERIEL ET METHODES

I. Résultats complémentaires

Plasmides

Les sites 2D et 2G, ont été clonés dans le plasmide pGhost9 pour créer les plasmides pCL362 et pCL366 respectivement, comme décrit pour le plasmide pCL231 contenant le site *dif_{SL}* de 31pb (Le Bourgeois *et al.*, 2007). Pour cela, les oligonucléotides correspondants ont été hybridés et ligués au plasmide pGhost9 digéré au préalable par l'enzyme *Xma*I.

Oligonucléotides

Nom	Séquence de 5' en 3'	Informations et figure associée
oligo1p	ATC TTT CCG AAA AAC TGT AAT TTT CTT GAC A	31pb, figure 4
oligo2p	TGT CAA GAA AAT TAC AGT TTT TCG GAA AGA T	
dif31	ATC TTT CCG AAA AAC TGT AAT TTT CTT GAC AAT T	34pb, figure 4
dif32	AAT TGT CAA GAA AAT TAC AGT TTT TCG GAA AGA T	
dif61	ATC TTT CCG AAA AAC TGT AAT TTT CTT GAC AAT TGG A	37pb, figure 4
dif62	TCC AAT TGT CAA GAA AAT TAC AGT TTT TCG GAA AGA T	
dif373	CAG TTT TTC GGA AAG AT	Hybridation avec dif61 : substrat suicide, figure 5
dif374	TCC AAT TGT CAA GAA AAT T	
difetP1	GAC GGT ATC GAT AAG CTT GAT A	Avec oligo2p amplification de 77pb, Figure 4
difetP2	CCG GGG ATC CTC TAG AAC TA	Avec oligo1p amplification de 66pb, figure 4
Site 2D1	CCG GGT AAC ATT GTC AAG AAA AAC TGT AAT TTT CTT GAC AAT	Clonage plasmide pCL361
Site 2D2	CCG GAT TGT CAA GAA AAT TAC AGT TTT TCT TGA CAA TGT TAC	
Site 2G1	CCG GGT AAC ATC TTT CCG AAA AAC TGT AAT TTT CGG AAA GAT	Clonage plasmide pCL365
Site 2G2	CCG GAT CTT TCC GAA AAT TAC AGT TTT TCG GAA AGA TGT TAC	
difP2	CCT AGC GGA CTC TAG AGG AT	Avec difetP1 amplification de 142pb, figure 7
HJ2G1	CTG CCG TGA TCA CGC TGA ACG CGT TTT AGC ATC TTT CCG AAA AAC TGT AAT TTT CGG AAA GAT TGG AGG CCT AAC GCC TAA AGC GGC CGC CTA GTC C	HJ2G, figure 8
HJ2G2	GGA CTA GGC GGC CGC TTT AGG CGT TAG GCC TCC AAT CTT TCC GAA AAT TAC AGT TTT TCG GAA AGA TCG ACC GTT GCC GGA TCC GCT GC	

HJ2G3	GGA TTC GAG ATC TCA GGA TGT CTC CAA TCT TTC CGA AAA TTA CAG TTT TTC GGA AAG ATG CTA AAA CGC GTT CAG CGT GAT CAC GGC AG	
HJ2G4	GCA GCG GAT CCG GCA ACG GTC GAT CTT TCC GAA AAA CTG TAA TTT TCG GAA AGA TTG GAG ACA TCC TGA GAT CTC GAA TCC	
HJS2G1	CTG CCG TGA TCA CGC TGA ACG CGT TTT AGC ATC TTT CCG AAA ATT AGT AAT TTT CGG AAA GAT TGG AGG CCT AAC GCC TAA AGC GGC CGC CTA GTC C	HJS2G, figure 8
HJS2G2	GGA CTA GGC GGC CGC TTT AGG CGT TAG GCC TCC AAT CTT TCC GAA AAT TAC TAA TTT TCG GAA AGA TCG ACC GTT GCC GGA TCC GCT GC	
HJS2G3	GGA TTC GAG ATC TCA GGA TGT CTC CAA TCT TTC CGA AAA TTA CTA ATT TTC GGA AAG ATG CTA AAA CGC GTT CAG CGT GAT CAC GGC AG	
HJS2G4	GCA GCG GAT CCG GCA ACG GTC GAT CTT TCC GAA AAT TAG TAA TTT TCG GAA AGA TTG GAG ACA TCC TGA GAT CTC GAA TCC	
HJS1	CTG CCG TGA TCA CGC TGA ACG CGT TTT AGC ATC TTT CCG AAA ATT AGT AAT TTT CTT GAC AAT TGG AGG CCT AAC GCC TAA AGC GGC CGC CTA GTC C	HJS, figure 8
HJS2	GGA CTA GGC GGC CGC TTT AGG CGT TAG GCC TCC AAT TGT CAA GAA AAT TAC TAA TTT TCG GAA AGA TCG ACC GTT GCC GGA TCC GCT GC	
HJS3	GGA TTC GAG ATC TCA GGA TGT CTC CAA TTG TCA AGA AAA TTA CTA ATT TTC GGA AAG ATG CTA AAA CGC GTT CAG CGT GAT CAC GGC AG	
HJS4	GCA GCG GAT CCG GCA ACG GTC GAT CTT TCC GAA AAT TAG TAA TTT TCT TGA CAA TTG GAG ACA TCC TGA GAT CTC GAA TCC	
HJ1	CTG CCG TGA TCA CGC TGA ACG CGT TTT AGC ATC TTT CCG AAA AAC TGT AAT TTT CTT GAC AAT TGG AGG CCT AAC GCC TAA AGC GGC CGC CTA GTC C	HJ, figure 7
HJ2	GGA CTA GGC GGC CGC TTT AGG CGT TAG GCC TCC AAT TGT CAA GAA AAT TAC AGT TTT TCG GAA AGA TCG ACC GTT GCC GGA TCC GCT GC	
HJ3	GGA TTC GAG ATC TCA GGA TGT CTC CAA TTG TCA AGA AAA TTA CAG TTT TTC GGA AAG ATG CTA AAA CGC GTT CAG CGT GAT CAC GGC AG	
HJ4	GCA GCG GAT CCG GCA ACG GTC GAT CTT TCC GAA AAA CTG TAA TTT TCT TGA CAA TTG GAG ACA TCC TGA GAT CTC GAA TCC	
HJ suicide 1.1	CTG CCG TGA TCA CGC TGA ACG CGT TTT AGC ATC TTT CCG AAA AAC TG	Hybridation avec HJ2, HJ3 et HJ4 : HJS1, figure 7
HJ suicide 1.2	TAA TTT TCT TGA CAA TTG GAG GCC TAA CGC CTA AAG CGG CCG CCT AGT CC	
HJ suicide 2.1	CTG CCG TGA TCA CGC TGA ACG CGT TTT AGC ATC TTT CCG AAA AAC TGT A	Hybridation avec HJ2, HJ3 et HJ4 : HJS2, figure 7
HJ suicide 2.2	ATT TTC TTG ACA ATT GGA GGC CTA ACG CCT AAA GCG GCC GCC TAG TCC	

Préparation des sondes radiomarquées

Marquage des oligonucléotides en 5'. L'oligonucléotide 1, formant le brin supérieur de l'ADN, a été marqué en 5' avec du γ - ^{32}P par la T4 DNA polynucleotide kinase (Biolabs).

Hybridation des oligonucléotides. L'oligonucléotide marqué a été purifié par passage sur colonne MicroSpin G-25 (GE Healthcare). Ont ensuite été ajoutés en quantité deux fois plus importante que celle de l'oligonucléotide marqué, l'oligonucléotide complémentaire formant le brin inférieur de l'ADN ou les deux oligonucléotides pour les substrats suicides, les 3 oligonucléotides complémentaires pour former les jonctions de Holliday, ou les 4 pour les jonctions de Holliday suicides. L'hybridation a été effectuée en chauffant à 100°C et en laissant diminuer la température sur la nuit.

Amplification par PCR. Les ADN portant les sites 2D, 2G et *dif_{SL}* aux extrémités droite ou gauche ont été amplifiés à partir des plasmides pCL366, pCL362 et pCL231, respectivement. Les ADN portant les sites 2D et 2G font 142pb et ont été amplifiés grâce aux amorces difetP1 et difP2. L'ADN de 66pb portant le site *dif_{SL}* à l'extrémité droite a été amplifié en utilisant les amorces difetP1 et oligo2p, l'ADN portant le site *dif_{SL}* à l'extrémité gauche a été amplifié grâce aux amorces oligo1p et difetP2. La réaction de PCR a été réalisée en utilisant comme ADN polymérase la Phusion (Finnzymes). Après amplification, les ADN ont été purifiés par passage sur colonne MicroSpin G-25 (GE Healthcare).

Purification sur gel de polyacrylamide. Tous les ADN de 66pb à 142pb marqués radioactivement ont été déposés sur un gel de polyacrylamide 5% puis séparés par migration à 150V pendant 1h30 à température ambiante. Les ADN de 31pb, 34pb et 37pb, ainsi que les substrats suicides, ont été séparés sur un gel de polyacrylamide 20% à 150V à 4°C sur la nuit. Les jonctions de Holliday et les jonctions de Holliday suicides, ont été séparées sur un gel de polyacrylamide 5% et migrées à 150V à température ambiante pendant 2h. Les bandes d'intérêt ont été révélées après exposition sur un film (Kodak), puis découpées dans le gel. L'ADN a été élué du gel sur la nuit dans du tampon à 10mM Tris HCl pH8, 1mM EDTA, 0.2% SDS, 0.3M NaCl, et 1mg/ml glycogène. L'ADN a ensuite été purifié par précipitation à l'éthanol et repris dans 20µl d'H₂O mQ.

Expériences de retards sur gel

Les réactions ont été effectuées dans un tampon contenant 10mM Tris HCl (pH 7,7), 100mM KCl, 5mM Spermidine, 2mM EDTA, 2mM DTT, 10µg/ml de BSA, 15% glycérol et 1µg de polydIdC avec 10000 cpm d'ADN radiomarké, ainsi que des concentrations croissantes en protéines comme indiqué. Les réactions ont été incubées 30 min à 30°C puis déposées et séparées sur un gel d'électrophorèse natif TGE (25mM Tris base, 190mM Glycine, 1mM EDTA) à 5% de polyacrylamide pendant 3h15 à 150 V à 4°C ou sur gel à 10

% de polyacrylamide (ADN de 30pb) pendant 3h15 à 200 V à 4°C. Les gels ont été séchés et analysés avec un Fuji PhosphorImager.

Expériences de coupure sur substrats suicides

Les réactions ont été effectuées comme décrit précédemment pour les expériences de retards sur gel. Après incubations 30 min à 30°C, les réactions ont été arrêtées par ajout de 0,1% de SDS et 1mM d'EDTA et déposées sur gel TGE à 5% de polyacrylamide et 0,1% SDS. Les ADN ont été séparés pendant 1h20 à 150 V à température ambiante. Les gels ont été séchés et analysés avec un Fuji PhosphorImager.

Résolution de jonctions de Holliday

Les réactions ont été effectuées dans un tampon contenant 25mM Hepes (pH 7,7), 40mM KCl, 0,25 mM EDTA, 0,5mM DTT, 10µg/ml de BSA, 10mM MgCl₂, 10% glycérol, et 1µg de polydIdC avec 10000 cpm d'ADN radiomarqué ainsi que, lorsque cela est indiqué, 50nM de protéines. Les réactions ont été incubées 50 min à 30°C puis arrêtées par ajout de 0,1% de SDS et 1mM d'EDTA. Les protéines ont ensuite été digérées pendant 1h à 37°C par la protéinase K. Les ADN ont ensuite été déposés et séparés sur un gel d'électrophorèse natif TGE à 5% de polyacrylamide pendant 2h à 150 V à température ambiante. Pour les jonctions de Holliday suicides, avant digestion par la protéinase K, la moitié de la réaction a été déposée sur gel TGE à 5% de polyacrylamide et 0,1% SDS. La migration a été effectuée pendant 2h à 150 V à température ambiante. Les gels ont été séchés et analysés avec un Fuji PhosphorImager.

II. Etude des motifs orientant la translocation de FtsK_{SL}

Souches et plasmides

Toutes les souches utilisées pour les expériences de recombinaisons *in vivo* sont dérivées de la souche d'*E. coli* K12 LN2666 (W1485F⁻ *leu thyA thi deoB* ou *C supE rpsL* (StR) et ont été décrites préalablement (papier). Les gènes codants pour les protéines 3 γ ont été commandés à GenScript. Ils sont constitués de trois répétitions du sous-domaine γ de FtsK (acides aminés 1266 à 1329 pour la protéine FtsK d'*E. coli* et 695 à 763 pour la protéine FtsK de *L. lactis*), séparés par une séquence flexible riche en glycine (Crozat *et al.*, 2010) (Figure 9). Pour la production et la purification des protéines, les gènes ont été insérés dans le plasmide pFSKB3X (GTP Technology) en aval de la séquence codant pour les étiquettes His et Flag (digestion XbaI-SalI), de manière à créer une fusion transcriptionnelle. Les plasmides résultants de cette construction sont pCL380 (3 γ_{Ec}) et pCL381 (3 γ_{Ll}). Pour l'expression des protéines *in vivo*, les gènes étiquetés ont été insérés dans un plasmide dérivé de pGB2 sous le contrôle du promoteur pARA (digestion NcoI-SalI). Les plasmides ainsi produits sont pCL374 (3 γ_{Ec}) et pCL375 (3 γ_{Ll}). Les plasmides exprimant les protéines XerC (pFC241) ou XerS (pCP56) ont été décrits (Papier).

Purification des protéines 3 γ

Production. Diluer au 1/100^{ème} dans du LB préchauffé à 42°C une culture de nuit de la souche d'*E. coli* K12 BL21(DE3) (Novagen) transformée au préalable par le plasmide pCL380 (3 γ_{Ec}) ou pCL381 (3 γ_{Ll}). Mettre en culture à 42°C jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 0.5. Induire la culture pendant 3 heures à température ambiante avec 0.1mM IPTG. Centrifuger les cellules à 5000rpm pendant 30min à 4°C. Laver le culot avec du tampon TN (10mM Tris et 100mM NaCl) et centrifuger 20min à 6000g. Reprendre le culot dans du tampon de Lyse (50mM tp phosphate pH 8, 500mM NaCl, 10mM Imidazole, 10% glycérol).

Lyse. Ajouter une tablette d'inhibiteur de protéases (EDTA-free protease inhibitor cocktail, Roche), 1mg/ml de lysosyme et 230 μ g/ml de RNaseA. Lyser les cellules par sonication et centrifuger à 14000 rpm à 4°C pendant 40min. Récupérer le surnageant et centrifuger une nouvelle fois 20min à 4°C à 14000rpm.

Purification sur colonne de Nickel. Equilibrer une colonne His-Trap FF de 1ml (GE Healthcare) avec 5 volumes de colonne de tampon de Lyse. Faire passer le surnageant et laver avec 10 volumes de colonne de tampon de lyse. Eluer avec un gradient de 10mM à 500mM Imidazole sur 20 volumes de colonnes. La protéine $3\gamma_{Ec}$, a été purifiée une deuxième fois sur colonne de nickel. Pour cela, les fractions d'intérêts ont au préalable été dialysées contre un volume 100 fois supérieur de tampon de lyse sans imidazole.

Filtration sur gel. Centrifuger les fractions d'intérêts 10min à 4°C à 14000rpm. Récupérer le surnageant et centrifuger 5min à 4°C à 14000rpm. Injecter sur une colonne HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare) équilibrée au préalable avec du tampon à 50mM Hepes pH 7.8, 400mM KCl, 1mM DTT et 0.5mM EDTA. Eluer à 0,5ml/min avec 1,5 volume de colonne. Ajouter 10% de glycérol aux protéines purifiées et conserver à -80°C.

Oligonucléotides

Nom	Séquence de 5' -> 3'	Taille de l'ADN et figure associée
KOPS8L2a	AGA AGA AGA AGA AGA AGA AG	20pb, figure 12
KOPS8L2b	CTT CTT CTT CTT CTT CTT CT	
AIMS1a	AAG AAG ATA AGA AGA TAA GAA GAT	24pb, figure 11
AIMS1b	ATC TTC TTA TCT TCT TAT CTT CTT	
AIMS2a	GAA TTA GAA TTA GAA TTA GA	20pb, figure 11
AIMS2b	TCT AAT TCT AAT TCT AAT TC	
AIMS3a	TGG AGA AAT GGA GAA ATG GAG AAA	24pb, figure 11
AIMS3b	TTT CTC CAT TTC TCC ATT TCT CCA	
AIMS4+a	TGG AGG AAT GGA GGA ATG GAG GAA	24pb, figure 11
AIMS4+b	TTC CTC CAT TCC TCC ATT CCT CCA	
KOPSEc1	GGG CAG GGC AGG GCA GGG	18pb, figure 10
KOPSEc2	CCC TGC CCT GCC CTG CCC	
KOPSEcA	GAT CTG AGG GGC AGG GTT CAT TGG GCA GGG TAG CAT GGG CAG GGT GAT GCG A	52pb, figure 15
KOPSEcB	TCG CAT CAC CCT GCC CAT GCT ACC CTG CCC AAT GAA CCC TGC CCC TCA GAT C	
KOPSL1a	GCT ATT GAA GAA GTT ACG A	19pb, figure 14
KOPSL1b	TCG TAA CTT CTT CAA TAG C	
KOPSL2a	GCT ATT GAA GAA GAT TAC GA	20pb, figure 13
KOPSL2b	TCG TAA TCT TCT TCA ATA GC	
KOPSL3a	GCT ATT AGA AGA AGT TAC GA	20pb, figure 13
KOPSL3b	TCG TAA CTT CTT CTA ATA GC	
KOPSL4a	GCT ATT AAG AAG AAT TAC GA	20pb, figure 13
KOPSL4b	TCG TAA TTC TTC TTA ATA GC	
KOPSEc20a	GCT ATT GGG CAG GGT TAC GA	20pb, figure 13
KOPSEc20b	TCG TAA CCC TGC CCA ATA GC	
KOPSALla	GAT CTG AGG AAG AAG TTC ATT GAA GAA GTA GCA TGA AGA AGT GAT GCG A	49pb, figure 15
KOPSALlb	TCG CAT CAC TTC TTC ATG CTA CTT CTT CAA TGA ACT TCT TCC TCA GAT C	

Expériences de retards sur gel

Préparation des sondes radiomarquées. L'oligonucléotide A ou 1, formant le brin supérieur de l'ADN, a été marqué en 5' avec du γ - ^{32}P par la T4 DNA polynucleotide kinase (Biolabs) puis purifié par deux passages sur colonne MicroSpin G-25 (GE Healthcare). Le double, en quantité, de l'oligonucléotide complémentaire a ensuite été ajouté. L'hybridation a été effectuée en chauffant à 100°C et en laissant diminuer la température sur la nuit.

Réactions d'interaction. Les réactions ont été effectuées dans un tampon contenant 25mM Hepes (pH 7,7), 40mM KCl, 0,25 mM EDTA, 0,5mM DTT, 10 $\mu\text{g/ml}$ de BSA, 10mM MgCl_2 , et 10% glycérol avec 5000 cpm d'ADN radiomarqué (~10nM), ainsi que lorsque cela est indiqué, 1 μg de polyIdC et 500nM ou 1 μM de protéines. Les réactions ont été incubées 5 min à température ambiante puis déposées et séparées sur un gel d'électrophorèse natif TBE à 5% de polyacrylamide pendant 2 heures à 150 V à 4°C. Les gels ont été séchés et analysés avec un Fuji PhosphorImager.

Expériences de recombinaison in vivo

Les expériences ont été réalisées comme décrit (Papier). Les souches portant les mutations $\Delta(lacI)$ et $xerC :: Gm$, les cassettes $dif-lacI-dif$ ou $dif_{SL}-lacI-dif_{SL}$ à la place du site dif , ainsi que l'allèle de $ftsK$ indiqué, ont été rendues compétentes puis transformées avec les plasmides exprimant XerC ou XerS et $3\gamma_{Ec}$ ou $3\gamma_{LI}$. Les transformants ont été étalés sur milieu LB agar contenant 20 $\mu\text{g/ml}$ de spectinomycine et 100 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline, et incubés à 37°C sur la nuit. 4 clones indépendants ont été resuspendus dans du LB additionné de spectinomycine, d'ampicilline, et lorsque c'est indiqué de 0,1% d'arabinose, puis incubés pendant 6h à 37°C, dilués et étalés sur LB agar plus X-gal. La fréquence de recombinaison a été calculée par la fréquence de perte du gène $lacI$ par cellule et par génération, en mesurant le rapport du nombre de colonies bleues sur le nombre total de colonies. Sur les figures sont représentés la moyenne et l'écart type de 4 mesures indépendantes.

Western Blot

Une unité de DO600 équivalente à 1, pour les souches mises en cultures lors des expériences de recombinaison in vivo, a été récupérée et resuspendue dans 300 μl de tampon 1% SDS, 10% glycérol, 0,1mM DTT, 0,2% bleu de bromophénol et 50mM Tris HCl pH6,8.

Les cellules ont été lysées par sonication et les protéines dénaturées par incubation 5 min à 95°C. Pour chaque échantillon une unité de DO600 de 0,04 a été utilisée. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-C Extra, GE Healthcare). Les membranes ont ensuite été incubées avec un anticorps primaire de souris anti-Flag (Sigma), puis avec un anticorps secondaire de lapin anti-IgG de souris et couplé à la phosphatase alcaline, selon le protocole du fabricant. La détection a été réalisée par un kit ECF (Thermo Scientific) et un BioImager (LAS-4000 FUJIFILM).

V- ANNEXES

V- ANNEXES

PROCOLE DE PURIFICATION DE XerS/XerSYF

Production :

- Diluer au 1/100^{ème} une préculture dans 1L de LB préchauffé
- Mettre en culture @ 42°C jusqu'à DO600 = 0.5-0.6 (2H-2H30)
- Induire la culture pendant 3 heures @RT avec 0.1mM IPTG (100uL du 1M)
- Centrifuger les cellules à 5000rpm pendant 30min à 4°C (JLA-8.1000 au LBME)
- Laver le culot avec 20mL de TN (froid) et passer dans Nalgen de 40mL.
- Centrifuger 20min à 6000g (JA-20)
- Reprendre le culot dans 20mL de tampon de Lyse (50mM tp phosphate pH8, 500mM NaCl, 10mM Imidazole, 10% glycérol).

Lyse :

- Ajouter 1mL du mix (à préparer au dernier moment) : 2tablettes IP, 100mg de lysosyme, 460uL RNase à 10mg/mL)
- Incuber 30min dans la glace, à 4°C
- Soniquer 11X45s avec une pause de 30s ans la glace.
- Centrifuger à 14000 rpm à 4° pendant 40min (JA-20)
- Passer le surnageant dans un nouveau Nalgen et centrifuger 20min à 14000rpm.

Purification sur colonne de Nickel :

- Equilibrer une colonne His-trap HP de 1mL avec le tampon de Lyse.
- Faire passer le surnageant et laver avec 10 volumes de colonne.
- Eluer avec un gradient de 10mM à 500mM Imidazole sur 20 volumes de colonnes.
- Récupérer des fractions de 500uL.
- La protéine est retrouvée dans les fractions B7 àB13.

Purification sur colonne Héparine :

- Pooler les fractions d'intérêt (=3,5uL) et diluer de moitié en ajoutant 3,5uL de tampon 50mM tp phosphate pH8, 10% glycérol et sans Imidazole, pour atteindre une concentration de 250mM NaCl et diluer l'Imidazole.
- Equilibrer une colonne Hi-trap HP Héparine de 1mL avec du tampon à 50mM tp phosphate pH8, 10% glycérol et 250mM NaCl.
- Faire passer les 7mL d'échantillon.
- Laver avec 5 volumes de colonne.
- Eluer avec un gradient de 250mM à 3M NaCL sur 10 volumes de colonne.
- Récupérer des fractions de 500uL.
- La protéine est retrouvée dans les fractions D15 et E1.

Gel filtration :

- Pooler les fractions et centrifuger 10min au max (14000rpm).
- Changer de tube eppendorf et centrifuger 5min au max (14000rpm).
- Injecter sur la colonne HiLoad 16/60 Superdex 200.
- Tp 40mMHepes pH 7.7, 400mM KCl, 1mMDTT, 0.5mMEDTA
- Pooler les fractions, concentrer et ajouter 10% de glycérol final.

PROCOLE DE PURIFICATION DE FtsK *L. lactis*

Production :

- Diluer au 1/100^{ème} une préculture dans 1L de LB préchauffé @ 37°C.
- Mettre en culture @ 37°C jusqu'à DO₆₀₀ = 0.5-0.6 (2H-2H30).
- Induire la culture pendant 1h30 @ 37°C avec 0.1mM IPTG (100µL du 1M).
- Centrifuger les cellules à 5000rpm pendant 30min à 4°C (JLA-8.1000).
- Laver le culot avec 20mL de TN (froid) et passer dans un Nalgen de 40mL.
- Centrifuger 20min à 6000g (JA-20).
- Reprendre le culot dans 20mL de tampon de Lyse (50mM tp phosphite pH8, 500mM NaCl, 10mM Imidazole, 10% glycérol).

Lyse :

- Ajouter 1mL du mix (à préparer au dernier moment) : 2 tablettes IP, 100mg de lysosyme, 460µL RNase à 10mg/mL).
- Incuber 30min dans la glace, à 4°C.
- Soniquer 11X45s avec une pause de 30s dans la glace.
- Centrifuger à 14000 rpm à 4° pendant 40min (JA-20).
- Passer le surnageant dans un nouveau Nalgen et centrifuger 20min à 14000rpm.

Purification sur colonne de Nickel : (programme *FtsKSL1LHisTrap*)

- Equilibrer une His-Trap FF de 1mL avec 5 volumes de colonne de tampon de Lyse.
- Faire passer le surnageant (~24mL) et récupérer des fractions de 4mL de FT
- Laver avec 5 volumes de colonne.
- Eluer avec un gradient de 10mM à 500mM Imidazole sur 10 volumes de colonnes.
- Récupérer des fractions de 500µL.
- La protéine est retrouvée dans les fractions A14 à B4 (= 3mL).

Purification sur colonne Héparine :

- Pooler les fractions d'intérêt (=3,5uL) et diluer en ajoutant 27mL de tampon 50mM tp phosphate pH8, 10% glycérol et sans Imidazole, pour atteindre une concentration de 50mM NaCl et diluer l'Imidazole.
- Equilibrer une colonne Hi-trap HP Héparine de 1mL avec du tampon à 50mM tp phosphate pH8, 10% glycérol et 50mM NaCl.
- Faire passer les 30mL d'échantillon.
- Laver avec 5 volumes de colonne.
- Eluer avec un gradient de 50mM à 1M NaCl sur 10 volumes de colonne.
- Récupérer des fractions de 500uL.
- La protéine est retrouvée dans les fractions D1 à D4 (~ 400mM NaCl).

PROTOCOLE DE PURIFICATION DU 3 γ *E. coli*

Production :

- Diluer au 1/100^{ème} une culture de nuit dans 1L de LB préchauffé @ 42°C.
- Mettre en culture @ 42°C jusqu'à DO₆₀₀ = 0.5-0.6 (2H-2H30).
- Induire la culture pendant 3 heures @RT avec 0.1mM IPTG (100 μ L du 1M).
- Centrifuger les cellules à 5000rpm pendant 30min à 4°C (JLA-8.1000 au LBME).
- Laver le culot avec 20mL de TN (froid) et passer dans un Nalgen de 40mL.
- Centrifuger 20min à 6000g (JA-20).
- Reprendre le culot dans 20mL de tampon de Lyse (50mM tp phosphite pH8, 500mM NaCl, 10mM Imidazole, 10% glycérol).

Lyse :

- Ajouter 1mL du mix (à préparer au dernier moment) : 2 tablettes IP, 100mg de lysosyme, 460 μ L RNase à 10mg/mL).
- Incuber 30min dans la glace, à 4°C.
- Soniquer 11X45s avec une pause de 30s dans la glace.
- Centrifuger à 14000 rpm à 4° pendant 40min (JA-20).
- Passer le surnageant dans un nouveau Nalgen et centrifuger 20min à 14000rpm.

Purification sur colonne de Nickel : (programme : *3GcoliHisTrap*)

- Equilibrer une His-Trap FF de 1mL avec 5 volumes de colonne de tampon de Lyse.
- Faire passer le surnageant (~22mL) et récupérer des fractions de 4mL de FT
- Laver avec 10 volumes de colonne.
- Eluer avec un gradient de 10mM à 500mM Imidazole sur 20 volumes de colonnes.
- Récupérer des fractions de 500 μ L.
- La protéine est retrouvée dans les fractions A14 à B11.

Purification sur colonne de Nickel : (programme : *3GcoliHisTrap2*)

- Pooler les fractions d'intérêts (=7,5mL) et dialyser contre du tampon de lyse sans imidazole 50mM tp phosphate pH8, 10% glycérol, pour atteindre une concentration de 50mM NaCl et diluer l'Imidazole.
- Equilibrer une His-Trap FF de 1mL avec 5 volumes de colonne de tampon de Lyse.
- Faire passer le surnageant à 1mL/min.
- Laver avec 10 volumes de colonne.
- Eluer en 3 étapes : 15% de 500mM Imidazole sur 3 volumes de colonnes puis 40% sur 5 volumes et 60% sur 2 volumes. Finir avec 5 volumes à 100%.
- Récupérer des fractions de 500 μ L.
- La protéine est retrouvée dans les fractions D1 à E10.

Gel filtration :

- Pooler les fractions E3 à E8 (=3mL) et centrifuger 10min au max (14000rpm).
- Changer de tube eppendorf et centrifuger 5min au max (14000rpm).
- Injecter sur la colonne HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade.
- Tampon : 50mM Hepes pH 7.8, 400mM KCl, 1mM DTT, 0.5mM EDTA.
- Eluer à 0,5mL/min avec 1,5 volume de colonne
- Récupérer des fractions de 4mL jusqu'à 80min environ puis des fractions de 500 μ L.
- La protéine est retrouvée dans les fractions 81 à 87 (2x 3 γ ?) et 93 à 101.
- Pooler les fractions et ajouter 10% de glycérol final.

PROTOCOLE DE PURIFICATION DU 3 γ *L. lactis*

Production :

- Diluer au 1/100^{ème} une préculture dans 200mL de LB préchauffé @ 42°C.
- Mettre en culture @ 42°C jusqu'à DO₆₀₀ = 0.5-0.6 (2H-2H30).
- Induire la culture pendant 3 heures @RT avec 0.1mM IPTG (20 μ L du 1M).
- Centrifuger les cellules à 5000rpm pendant 30min à 4°C (JA-14).
- Laver le culot avec 10mL de TN (froid) et passer dans un Nalgen de 40mL.
- Centrifuger 20min à 6000g (JA-20).
- Reprendre le culot dans 10mL de tampon de Lyse (50mM tp phosphite pH8, 500mM NaCl, 10mM Imidazole, 10% glycérol).

Lyse :

- Ajouter 500 μ L du mix (à préparer au dernier moment) : 1 tablettes IP, 50mg de lysosyme, 230 μ L RNase à 10mg/mL).
- Incuber 30min dans la glace, à 4°C.
- Soniquer 5X45s avec une pause de 30s dans la glace.
- Centrifuger à 14000 rpm à 4° pendant 40min (JA-20).
- Passer le surnageant dans un nouveau Nalgen et centrifuger 20min à 14000rpm.

Purification sur colonne de Nickel : (programme 3*GlactisHisTrap*)

- Equilibrer une His-Trap FF de 1mL avec 5 volumes de colonne de tampon de Lyse.
- Faire passer le surnageant (~12mL) et récupérer des fractions de 4mL de FT
- Laver avec 10 volumes de colonne.
- Eluer avec un gradient de 10mM à 500mM Imidazole sur 20 volumes de colonnes.
- Récupérer des fractions de 500 μ L.
- La protéine est retrouvée dans les fractions A12 à B4 (= 4mL).

Gel filtration :

- Pooler les fractions A12 à B1 + B4 (=3mL) et centrifuger 10min au max (14000rpm).
- Changer de tube eppendorf et centrifuger 5min au max (14000rpm).
- Injecter sur la colonne HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade.
- Tampon : 50mM Hepes pH 7.8, 400mM KCl, 1mM DTT, 0.5mM EDTA.
- Eluer à 0,5mL/min avec 1,5 volume de colonne
- Récupérer des fractions de 4mL jusqu'à 100min environ puis des fractions de 500 μ L.
- A partir de 225min environ éluer à 1mL/min.
- La protéine est retrouvée dans les fractions 72 à 100.
- Pooler les fractions et ajouter 10% de glycérol final.

VI- BIBLIOGRAPHIE

VI- BIBLIOGRAPHIE

- Adachi, S., Fukushima, T., et Hiraga, S. (2008). Dynamic events of sister chromosomes in the cell cycle of *Escherichia coli*. *Genes Cells* *13*, 181-197.
- Adams, D. E., Shekhtman, E. M., Zechiedrich, E. L., Schmid, M. B., et Cozzarelli, N. R. (1992). The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell* *71*, 277-288.
- Alén, C., Sherratt, D. J., et Colloms, S. D. (1997). Direct interaction of aminopeptidase A with recombination site DNA in Xer site-specific recombination. *EMBO J* *16*, 5188-5197.
- Arciszewska, L. K., Baker, R. A., Hallet, B., et Sherratt, D. J. (2000). Coordinated control of XerC and XerD catalytic activities during Holliday junction resolution. *J. Mol. Biol* *299*, 391-403.
- Arciszewska, L. K., et Sherratt, D. J. (1995). Xer site-specific recombination in vitro. *EMBO J* *14*, 2112-2120.
- Ausmees, N., Wahlstedt, H., Bagchi, S., Elliot, M. A., Buttner, M. J., et Flärdh, K. (2007). SmeA, a small membrane protein with multiple functions in *Streptomyces* sporulation including targeting of a SpoIIIE/FtsK-like protein to cell division septa. *Mol. Microbiol* *65*, 1458-1473.
- Aussel, L., Barre, F. X., Aroyo, M., Stasiak, A., Stasiak, A. Z., et Sherratt, D. (2002). FtsK Is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell* *108*, 195-205.
- Austin, S., Ziese, M., et Sternberg, N. (1981). A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* *25*, 729-736.
- Barre, F. X., Aroyo, M., Colloms, S. D., Helfrich, A., Cornet, F., et Sherratt, D. J. (2000). FtsK functions in the processing of a Holliday junction intermediate during bacterial chromosome segregation. *Genes Dev* *14*, 2976-2988.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E. L. L., *et al.* (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* *32*, D138-141.
- Bates, D., et Kleckner, N. (2005). Chromosome and replisome dynamics in *E. coli*: loss of sister cohesion triggers global chromosome movement and mediates chromosome segregation. *Cell* *121*, 899-911.
- Bell, C. E. (2005). Structure and mechanism of *Escherichia coli* RecA ATPase. *Mol. Microbiol* *58*, 358-366.

- Bianco, P. R., et Kowalczykowski, S. C. (1997). The recombination hotspot Chi is recognized by the translocating RecBCD enzyme as the single strand of DNA containing the sequence 5'-GCTGGTGG-3'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *94*, 6706-6711.
- Bigot, S., Corre, J., Louarn, J., Cornet, F., et Barre, F. (2004). FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein. *Mol. Microbiol* *54*, 876-886.
- Bigot, S., et Marians, K. J. (2010). DNA chirality-dependent stimulation of topoisomerase IV activity by the C-terminal AAA+ domain of FtsK. *Nucleic Acids Res.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate1.inist.fr/pubmed/20081205> [Accédé Avril 3, 2010].
- Bigot, S., Saleh, O. A., Cornet, F., Allemand, J., et Barre, F. (2006). Oriented loading of FtsK on KOPS. *Nat. Struct. Mol. Biol* *13*, 1026-1028.
- Bigot, S., Saleh, O. A., Lesterlin, C., Pages, C., El Karoui, M., Dennis, C., Grigoriev, M., Allemand, J., Barre, F., et Cornet, F. (2005). KOPS: DNA motifs that control E. coli chromosome segregation by orienting the FtsK translocase. *EMBO J* *24*, 3770-3780.
- Bigot, S., Sivanathan, V., Possoz, C., Barre, F., et Cornet, F. (2007). FtsK, a literate chromosome segregation machine. *Mol. Microbiol* *64*, 1434-1441.
- Biller, S. J., et Burkholder, W. F. (2009). The *Bacillus subtilis* SftA (YtpS) and SpoIIIE DNA translocases play distinct roles in growing cells to ensure faithful chromosome partitioning. *Mol. Microbiol* *74*, 790-809.
- Biswas, I., Maguin, E., Ehrlich, S. D., et Gruss, A. (1995). A 7-base-pair sequence protects DNA from exonucleolytic degradation in *Lactococcus lactis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *92*, 2244-2248.
- Blake, J. A., Ganguly, N., et Sherratt, D. J. (1997). DNA sequence of recombinase-binding sites can determine Xer site-specific recombination outcome. *Mol. Microbiol* *23*, 387-398.
- Blakely, G., May, G., McCulloch, R., Arciszewska, L. K., Burke, M., Lovett, S. T., et Sherratt, D. J. (1993). Two related recombinases are required for site-specific recombination at dif and cer in *E. coli* K12. *Cell* *75*, 351-361.
- Blakely, G., et Sherratt, D. (1996a). Determinants of selectivity in Xer site-specific recombination. *Genes Dev* *10*, 762-773.
- Blakely, G. W., et Sherratt, D. J. (1996b). Cis and trans in site-specific recombination. *Mol. Microbiol* *20*, 234-237.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., *et al.* (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* *277*, 1453-1462.
- Bonné, L., Bigot, S., Chevalier, F., Allemand, J., et Barre, F. (2009). Asymmetric DNA requirements in Xer recombination activation by FtsK. *Nucleic Acids Res* *37*, 2371-

2380.

- Bouvier, M., Demarre, G., et Mazel, D. (2005). Integron cassette insertion: a recombination process involving a folded single strand substrate. *EMBO J* 24, 4356-4367.
- Bouvier, M., Ducos-Galand, M., Loot, C., Bikard, D., et Mazel, D. (2009). Structural features of single-stranded integron cassette attC sites and their role in strand selection. *PLoS Genet* 5, e1000632.
- Bregu, M., Sherratt, D. J., et Colloms, S. D. (2002). Accessory factors determine the order of strand exchange in Xer recombination at psi. *EMBO J* 21, 3888-3897.
- Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B., et Guédon, G. (2002). Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol. Microbiol* 46, 601-610.
- Burrus, V., et Waldor, M. K. (2004). Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res. Microbiol* 155, 376-386.
- Campos, J., Martínez, E., Suzarte, E., Rodríguez, B. L., Marrero, K., Silva, Y., Ledón, T., del Sol, R., et Fando, R. (2003). VGJ phi, a novel filamentous phage of *Vibrio cholerae*, integrates into the same chromosomal site as CTX phi. *J. Bacteriol* 185, 5685-5696.
- Cao, B., Porollo, A., Adamczak, R., Jarrell, M., et Meller, J. (2006). Enhanced recognition of protein transmembrane domains with prediction-based structural profiles. *Bioinformatics* 22, 303-309.
- Capiaux, H., Cornet, F., Corre, J., Guijo, M. I., Péral, K., Rebollo, J. E., et Louarn, J. M. (2001). Polarization of the *Escherichia coli* chromosome. A view from the terminus. *Biochimie* 83, 161-170.
- Capiaux, H., Lesterlin, C., Péral, K., Louarn, J. M., et Cornet, F. (2002). A dual role for the FtsK protein in *Escherichia coli* chromosome segregation. *EMBO Rep* 3, 532-536.
- Carnoy, C., et Roten, C. (2009). The dif/Xer recombination systems in proteobacteria. *PLoS ONE* 4, e6531.
- Chaconas, G. (2005). Hairpin telomeres and genome plasticity in *Borrelia*: all mixed up in the end. *Mol. Microbiol* 58, 625-635.
- Chalker, A. F., Lupas, A., Ingraham, K., So, C. Y., Lunsford, R. D., Li, T., Bryant, A., Holmes, D. J., Marra, A., Pearson, S. C., *et al.* (2000). Genetic characterization of gram-positive homologs of the XerCD site-specific recombinases. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol* 2, 225-233.
- Champoux, J. J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem* 70, 369-413.
- Chen, Y., et Rice, P. A. (2003). New insight into site-specific recombination from Flp recombinase-DNA structures. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32, 135-159.

- Cheng, C., Kussie, P., Pavletich, N., et Shuman, S. (1998). Conservation of structure and mechanism between eukaryotic topoisomerase I and site-specific recombinases. *Cell* 92, 841-850.
- Cheng, Q., Paszkiet, B. J., Shoemaker, N. B., Gardner, J. F., et Salyers, A. A. (2000). Integration and excision of a *Bacteroides* conjugative transposon, CTnDOT. *J. Bacteriol* 182, 4035-4043.
- Colloms, S. D., Alén, C., et Sherratt, D. J. (1998). The ArcA/ArcB two-component regulatory system of *Escherichia coli* is essential for Xer site-specific recombination at psi. *Mol. Microbiol* 28, 521-530.
- Colloms, S. D., Bath, J., et Sherratt, D. J. (1997). Topological selectivity in Xer site-specific recombination. *Cell* 88, 855-864.
- Colloms, S. D., McCulloch, R., Grant, K., Neilson, L., et Sherratt, D. J. (1996). Xer-mediated site-specific recombination in vitro. *EMBO J* 15, 1172-1181.
- Cornet, F., Louarn, J., Patte, J., et Louarn, J. M. (1996). Restriction of the activity of the recombination site dif to a small zone of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev* 10, 1152-1161.
- Cornet, F., Mortier, I., Patte, J., et Louarn, J. M. (1994). Plasmid pSC101 harbors a recombination site, psi, which is able to resolve plasmid multimers and to substitute for the analogous chromosomal *Escherichia coli* site dif. *J. Bacteriol* 176, 3188-3195.
- Corre, J., Patte, J., et Louarn, J. M. (2000). Prophage lambda induces terminal recombination in *Escherichia coli* by inhibiting chromosome dimer resolution. An orientation-dependent cis-effect lending support to bipolarization of the terminus. *Genetics* 154, 39-48.
- Corre, J., et Louarn, J. (2002). Evidence from terminal recombination gradients that FtsK uses replicore polarity to control chromosome terminus positioning at division in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* 184, 3801-3807.
- Crozat, E., Meglio, A., Allemand, J., Chivers, C. E., Howarth, M., Vénien-Bryan, C., Grainge, I., et Sherratt, D. J. (2010). Separating speed and ability to displace roadblocks during DNA translocation by FtsK. *EMBO J* 29, 1423-1433.
- Das, B., Bischerour, J., Val, M., et Barre, F. (2010). Molecular keys of the tropism of integration of the cholera toxin phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 107, 4377-4382.
- Davenport, C. F., et Tümmler, B. (2010). Abundant oligonucleotides common to most bacteria. *PLoS ONE* 5, e9841.
- Dedrick, R. M., Wildschutte, H., et McCormick, J. R. (2009). Genetic interactions of smc, ftsK, and parB genes in *Streptomyces coelicolor* and their developmental genome segregation phenotypes. *J. Bacteriol* 191, 320-332.
- Demarre, G., Frumerie, C., Gopaul, D. N., et Mazel, D. (2007). Identification of key structural

- determinants of the IntI1 integrase that influence attC x attI1 recombination efficiency. *Nucleic Acids Res* 35, 6475-6489.
- Dillingham, M. S., et Kowalczykowski, S. C. (2008). RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 72, 642-671, Table of Contents.
- Dixon, J. E., Shaikh, A. C., et Sadowski, P. D. (1995). The Flp recombinase cleaves Holliday junctions in trans. *Mol. Microbiol* 18, 449-458.
- Dorazi, R., et Dewar, S. J. (2000). Membrane topology of the N-terminus of the Escherichia coli FtsK division protein. *FEBS Lett* 478, 13-18.
- Dubarry, N., et Barre, F. (2010). Fully efficient chromosome dimer resolution in Escherichia coli cells lacking the integral membrane domain of FtsK. *EMBO J* 29, 597-605.
- Duggin, I. G., Wake, R. G., Bell, S. D., et Hill, T. M. (2008). The replication fork trap and termination of chromosome replication. *Mol. Microbiol* 70, 1323-1333.
- El Karoui, M., Schaeffer, M., Biaudet, V., Bolotin, A., Sorokin, A., et Gruss, A. (2000). Orientation specificity of the Lactococcus lactis Chi site. *Genes Cells* 5, 453-461.
- Ennifar, E., Meyer, J. E. W., Buchholz, F., Stewart, A. F., et Suck, D. (2003). Crystal structure of a wild-type Cre recombinase-loxP synapse reveals a novel spacer conformation suggesting an alternative mechanism for DNA cleavage activation. *Nucleic Acids Res* 31, 5449-5460.
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in Bacillus subtilis. *Nat. Rev. Microbiol* 1, 117-126.
- Espeli, O., Lee, C., et Mariani, K. J. (2003a). A physical and functional interaction between Escherichia coli FtsK and topoisomerase IV. *J. Biol. Chem* 278, 44639-44644.
- Espeli, O., Levine, C., Hassing, H., et Mariani, K. J. (2003b). Temporal regulation of topoisomerase IV activity in E. coli. *Mol. Cell* 11, 189-201.
- Esposito, D., et Scocca, J. J. (1997). The integrase family of tyrosine recombinases: evolution of a conserved active site domain. *Nucleic Acids Res* 25, 3605-3614.
- Esposito, D., Thrower, J. S., et Scocca, J. J. (2001). Protein and DNA requirements of the bacteriophage HP1 recombination system: a model for intasome formation. *Nucleic Acids Res* 29, 3955-3964.
- Frumerie, C., Ducos-Galand, M., Gopaul, D. N., et Mazel, D. (2010). The relaxed requirements of the integrase cleavage site allow predictable changes in integrase target specificity. *Nucleic Acids Res* 38, 559-569.
- Gajiwala, K. S., et Burley, S. K. (2000). Winged helix proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol* 10, 110-116.

- Ganapathiraju, M., Balakrishnan, N., Reddy, R., et Klein-Seetharaman, J. Transmembrane helix prediction using amino acid property features and latent semantic analysis. *BMC Bioinformatics* 9, S4-S4.
- Ghosh, K., Guo, F., et Van Duyne, G. D. (2007). Synapsis of loxP sites by Cre recombinase. *J. Biol. Chem* 282, 24004-24016.
- Ghosh, K., Lau, C., Gupta, K., et Van Duyne, G. D. (2005). Preferential synapsis of loxP sites drives ordered strand exchange in Cre-loxP site-specific recombination. *Nat. Chem. Biol* 1, 275-282.
- Gibb, B., Gupta, K., Ghosh, K., Sharp, R., Chen, J., et Van Duyne, G. D. (2010). Requirements for catalysis in the Cre recombinase active site. *Nucleic Acids Res.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate1.inist.fr/pubmed/20462863> [Accédé Mai 19, 2010].
- Goehring, N. W., et Beckwith, J. (2005). Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr. Biol* 15, R514-526.
- Gopaul, D. N., et Duyne, G. D. (1999). Structure and mechanism in site-specific recombination. *Curr. Opin. Struct. Biol* 9, 14-20.
- Gourlay, S. C., et Colloms, S. D. (2004). Control of Cre recombination by regulatory elements from Xer recombination systems. *Mol. Microbiol* 52, 53-65.
- Graham, J. E., Sivanathan, V., Sherratt, D. J., et Arciszewska, L. K. (2010). FtsK translocation on DNA stops at XerCD-dif. *Nucleic Acids Res* 38, 72-81.
- Grainge, I., et Jayaram, M. (1999). The integrase family of recombinase: organization and function of the active site. *Mol. Microbiol* 33, 449-456.
- Grainge, I., Bregu, M., Vazquez, M., Sivanathan, V., Ip, S. C. Y., et Sherratt, D. J. (2007). Unlinking chromosome catenanes in vivo by site-specific recombination. *EMBO J* 26, 4228-4238.
- Grenga, L., Luzi, G., Paolozzi, L., et Ghelardini, P. (2008). The Escherichia coli FtsK functional domains involved in its interaction with its divisome protein partners. *FEMS Microbiol. Lett* 287, 163-167.
- Grindley, N. D. F., Whiteson, K. L., et Rice, P. A. (2006). Mechanisms of site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem* 75, 567-605.
- Groth, A. C., et Calos, M. P. (2004). Phage integrases: biology and applications. *J. Mol. Biol* 335, 667-678.
- Guo, F., Gopaul, D. N., et van Duyne, G. D. (1997). Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature* 389, 40-46.
- Hallet, B., Arciszewska, L. K., et Sherratt, D. J. (1999). Reciprocal control of catalysis by the tyrosine recombinases XerC and XerD: an enzymatic switch in site-specific

- recombination. *Mol. Cell* 4, 949-959.
- Hallet, B., et Sherratt, D. J. (1997). Transposition and site-specific recombination: adapting DNA cut-and-paste mechanisms to a variety of genetic rearrangements. *FEMS Microbiol. Rev* 21, 157-178.
- Hendrickson, H., et Lawrence, J. G. (2007). Mutational bias suggests that replication termination occurs near the dif site, not at Ter sites. *Mol. Microbiol* 64, 42-56.
- Hendrickson, H., et Lawrence, J. G. (2006). Selection for chromosome architecture in bacteria. *J. Mol. Evol* 62, 615-629.
- Hickman, A. B., Waninger, S., Scocca, J. J., et Dyda, F. (1997). Molecular organization in site-specific recombination: the catalytic domain of bacteriophage HP1 integrase at 2.7 Å resolution. *Cell* 89, 227-237.
- Hojgaard, A., Szerlong, H., Tabor, C., et Kuempel, P. (1999). Norfloxacin-induced DNA cleavage occurs at the dif resolvase locus in *Escherichia coli* and is the result of interaction with topoisomerase IV. *Mol. Microbiol* 33, 1027-1036.
- Huber, K. E., et Waldor, M. K. (2002). Filamentous phage integration requires the host recombinases XerC and XerD. *Nature* 417, 656-659.
- Iida, T., Makino, K., Nasu, H., Yokoyama, K., Tagomori, K., Hattori, A., Okuno, T., Shinagawa, H., et Honda, T. (2002). Filamentous bacteriophages of vibrios are integrated into the dif-like site of the host chromosome. *J. Bacteriol* 184, 4933-4935.
- Ip, S. C. Y., Bregu, M., Barre, F., et Sherratt, D. J. (2003). Decatenation of DNA circles by FtsK-dependent Xer site-specific recombination. *EMBO J* 22, 6399-6407.
- Jayaram, M. (2007). Split target specificity of ResT: a design for protein delivery, site selectivity and regulation of enzyme activity? *Mol. Microbiol* 64, 575-579.
- Jayaram, M., Mehta, S., Uzri, D., Voziyanov, Y., et Velmurugan, S. (2004). Site-specific recombination and partitioning systems in the stable high copy propagation of the 2-micron yeast plasmid. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol* 77, 127-172.
- Jensen, R. B. (2006). Analysis of the terminus region of the *Caulobacter crescentus* chromosome and identification of the dif site. *J. Bacteriol* 188, 6016-6019.
- Johansson, C., Kamali-Moghaddam, M., et Sundström, L. (2004). Integron integrase binds to bulged hairpin DNA. *Nucleic Acids Res* 32, 4033-4043.
- Kennedy, S. P., Chevalier, F., et Barre, F. (2008). Delayed activation of Xer recombination at dif by FtsK during septum assembly in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol* 68, 1018-1028.
- Klemm, P. (1986). Two regulatory fim genes, fimB and fimE, control the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *EMBO J* 5, 1389-1393.

- Kobryn, K., et Chaconas, G. (2001). The circle is broken: telomere resolution in linear replicons. *Curr. Opin. Microbiol* 4, 558-564.
- Labbate, M., Case, R. J., et Stokes, H. W. (2009). The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation. *Methods Mol. Biol* 532, 103-125.
- Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem* 58, 913-949.
- Laprise, J., Yoneji, S., et Gardner, J. F. (2010). Homology-dependent interactions determine the order of strand exchange by IntDOT recombinase. *Nucleic Acids Res* 38, 958-969.
- Le Bourgeois, P., Bugarel, M., Campo, N., Daveran-Mingot, M., Labonté, J., Lanfranchi, D., Lautier, T., Pagès, C., et Ritzenthaler, P. (2007). The unconventional Xer recombination machinery of Streptococci/Lactococci. *PLoS Genet* 3, e117.
- Lee, J., Jayaram, M., et Grainge, I. (1999). Wild-type Flp recombinase cleaves DNA in trans. *EMBO J* 18, 784-791.
- Lee, J., Tonozuka, T., et Jayaram, M. (1997). Mechanism of active site exclusion in a site-specific recombinase: role of the DNA substrate in conferring half-of-the-sites activity. *Genes Dev* 11, 3061-3071.
- Lee, L., et Sadowski, P. D. (2001). Directional resolution of synthetic holliday structures by the Cre recombinase. *J. Biol. Chem* 276, 31092-31098.
- Lee, L., Chu, L. C. H., et Sadowski, P. D. (2003). Cre induces an asymmetric DNA bend in its target loxP site. *J. Biol. Chem* 278, 23118-23129.
- Lesterlin, C., Barre, F., et Cornet, F. (2004). Genetic recombination and the cell cycle: what we have learned from chromosome dimers. *Mol. Microbiol* 54, 1151-1160.
- Lesterlin, C., Mercier, R., Boccard, F., Barre, F., et Cornet, F. (2005). Roles for replichores and macrodomains in segregation of the Escherichia coli chromosome. *EMBO Rep* 6, 557-562.
- Lesterlin, C., Pages, C., Dubarry, N., Dasgupta, S., et Cornet, F. (2008). Asymmetry of chromosome Replichores renders the DNA translocase activity of FtsK essential for cell division and cell shape maintenance in Escherichia coli. *PLoS Genet* 4, e1000288.
- Letzelter, C., Duguet, M., et Serre, M. (2004). Mutational analysis of the archaeal tyrosine recombinase SSV1 integrase suggests a mechanism of DNA cleavage in trans. *J. Biol. Chem* 279, 28936-28944.
- Levy, O., Ptacin, J. L., Pease, P. J., Gore, J., Eisen, M. B., Bustamante, C., et Cozzarelli, N. R. (2005). Identification of oligonucleotide sequences that direct the movement of the Escherichia coli FtsK translocase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102, 17618-17623.
- Li, Y., Youngren, B., Sergueev, K., et Austin, S. (2003). Segregation of the Escherichia coli chromosome terminus. *Mol. Microbiol* 50, 825-834.

- Lobry, J. R., et Louarn, J. (2003). Polarisation of prokaryotic chromosomes. *Curr. Opin. Microbiol* 6, 101-108.
- Löwe, J., Ellonen, A., Allen, M. D., Atkinson, C., Sherratt, D. J., et Grainge, I. (2008). Molecular mechanism of sequence-directed DNA loading and translocation by FtsK. *Mol. Cell* 31, 498-509.
- MacDonald, D., Demarre, G., Bouvier, M., Mazel, D., et Gopaul, D. N. (2006). Structural basis for broad DNA-specificity in integron recombination. *Nature* 440, 1157-1162.
- Malanowska, K., Yoneji, S., Salyers, A. A., et Gardner, J. F. (2007). CTnDOT integrase performs ordered homology-dependent and homology-independent strand exchanges. *Nucleic Acids Res* 35, 5861-5873.
- Martin, S. S., Pulido, E., Chu, V. C., Lechner, T. S., et Baldwin, E. P. (2002). The order of strand exchanges in Cre-LoxP recombination and its basis suggested by the crystal structure of a Cre-LoxP Holliday junction complex. *J. Mol. Biol* 319, 107-127.
- Massey, T. H., Aussel, L., Barre, F., et Sherratt, D. J. (2004). Asymmetric activation of Xer site-specific recombination by FtsK. *EMBO Rep* 5, 399-404.
- Massey, T. H., Mercogliano, C. P., Yates, J., Sherratt, D. J., et Löwe, J. (2006). Double-stranded DNA translocation: structure and mechanism of hexameric FtsK. *Mol. Cell* 23, 457-469.
- Mazel, D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiol* 4, 608-620.
- McLeod, S. M., et Waldor, M. K. (2004). Characterization of XerC- and XerD-dependent CTX phage integration in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol* 54, 935-947.
- Mercier, R., Petit, M., Schbath, S., Robin, S., El Karoui, M., Boccard, F., et Espéli, O. (2008). The MatP/matS site-specific system organizes the terminus region of the *E. coli* chromosome into a macrodomain. *Cell* 135, 475-485.
- Michel, B., Boubakri, H., Baharoglu, Z., LeMasson, M., et Lestini, R. (2007). Recombination proteins and rescue of arrested replication forks. *DNA Repair (Amst.)* 6, 967-980.
- Neilson, L., Blakely, G., et Sherratt, D. J. (1999). Site-specific recombination at dif by *Haemophilus influenzae* XerC. *Mol. Microbiol* 31, 915-926.
- Pease, P. J., Levy, O., Cost, G. J., Gore, J., Ptacin, J. L., Sherratt, D., Bustamante, C., et Cozzarelli, N. R. (2005). Sequence-directed DNA translocation by purified FtsK. *Science* 307, 586-590.
- Peng, H., et Marians, K. J. (1993). *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *J. Biol. Chem* 268, 24481-24490.
- Péral, K., Cornet, F., Merlet, Y., Delon, I., et Louarn, J. M. (2000). Functional polarization of

- the *Escherichia coli* chromosome terminus: the dif site acts in chromosome dimer resolution only when located between long stretches of opposite polarity. *Mol. Microbiol* *36*, 33-43.
- Picardeau, M., Lobry, J. R., et Hinnebusch, B. J. (1999). Physical mapping of an origin of bidirectional replication at the centre of the *Borrelia burgdorferi* linear chromosome. *Mol. Microbiol* *32*, 437-445.
- Possoz, C., Ribard, C., Gagnat, J., Pernodet, J. L., et Guérineau, M. (2001). The integrative element pSAM2 from *Streptomyces*: kinetics and mode of conjugal transfer. *Mol. Microbiol* *42*, 159-166.
- Ptacin, J. L., Nollmann, M., Becker, E. C., Cozzarelli, N. R., Pogliano, K., et Bustamante, C. (2008). Sequence-directed DNA export guides chromosome translocation during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Nat. Struct. Mol. Biol* *15*, 485-493.
- Ptacin, J. L., Nöllmann, M., Bustamante, C., et Cozzarelli, N. R. (2006). Identification of the FtsK sequence-recognition domain. *Nat. Struct. Mol. Biol* *13*, 1023-1025.
- Radman-Livaja, M., Biswas, T., Ellenberger, T., Landy, A., et Aihara, H. (2006). DNA arms do the legwork to ensure the directionality of lambda site-specific recombination. *Curr. Opin. Struct. Biol* *16*, 42-50.
- Rajeev, L., Malanowska, K., et Gardner, J. F. (2009). Challenging a paradigm: the role of DNA homology in tyrosine recombinase reactions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* *73*, 300-309.
- Rajeev, L., Segall, A., et Gardner, J. (2007). The bacteroides NBU1 integrase performs a homology-independent strand exchange to form a holliday junction intermediate. *J. Biol. Chem* *282*, 31228-31237.
- Recchia, G. D., et Sherratt, D. J. (1999). Conservation of xer site-specific recombination genes in bacteria. *Mol. Microbiol* *34*, 1146-1148.
- Reichmann, P., et Hakenbeck, R. (2002). A XerD recombinase with unusual active site motifs in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol* *4*, 101-110.
- Reijns, M., Lu, Y., Leach, S., et Colloms, S. D. (2005). Mutagenesis of PepA suggests a new model for the Xer/cer synaptic complex. *Mol. Microbiol* *57*, 927-941.
- Reyes-Lamothe, R., Possoz, C., Danilova, O., et Sherratt, D. J. (2008). Independent positioning and action of *Escherichia coli* replisomes in live cells. *Cell* *133*, 90-102.
- Ringrose, L., Lounnas, V., Ehrlich, L., Buchholz, F., Wade, R., et Stewart, A. F. (1998). Comparative kinetic analysis of FLP and cre recombinases: mathematical models for DNA binding and recombination. *J. Mol. Biol* *284*, 363-384.
- Saleh, O. A., Bigot, S., Barre, F., et Allemand, J. (2005). Analysis of DNA supercoil induction by FtsK indicates translocation without groove-tracking. *Nat. Struct. Mol. Biol* *12*, 436-440.

- Saleh, O. A., Pérals, C., Barre, F., et Allemand, J. (2004). Fast, DNA-sequence independent translocation by FtsK in a single-molecule experiment. *EMBO J* 23, 2430-2439.
- Salzberg, S. L., Salzberg, A. J., Kerlavage, A. R., et Tomb, J. F. (1998). Skewed oligomers and origins of replication. *Gene* 217, 57-67.
- Schmidt, J. W., Rajeev, L., Salyers, A. A., et Gardner, J. F. (2006). NBU1 integrase: evidence for an altered recombination mechanism. *Mol. Microbiol* 60, 152-164.
- Sciochetti, S. A., Piggot, P. J., et Blakely, G. W. (2001). Identification and characterization of the dif Site from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol* 183, 1058-1068.
- Sherratt, D. J., et Wigley, D. B. (1998). Conserved themes but novel activities in recombinases and topoisomerases. *Cell* 93, 149-152.
- Singleton, M. R., Dillingham, M. S., et Wigley, D. B. (2007). Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu. Rev. Biochem* 76, 23-50.
- Sirois, S., et Szatmari, G. (1995). Detection of XerC and XerD recombinases in gram-negative bacteria of the family Enterobacteriaceae. *J. Bacteriol* 177, 4183-4186.
- Sivanathan, V., Allen, M. D., de Bekker, C., Baker, R., Arciszewska, L. K., Freund, S. M., Bycroft, M., Löwe, J., et Sherratt, D. J. (2006). The FtsK gamma domain directs oriented DNA translocation by interacting with KOPS. *Nat. Struct. Mol. Biol* 13, 965-972.
- Sivanathan, V., Emerson, J. E., Pages, C., Cornet, F., Sherratt, D. J., et Arciszewska, L. K. (2009). KOPS-guided DNA translocation by FtsK safeguards *Escherichia coli* chromosome segregation. *Mol. Microbiol* 71, 1031-1042.
- Smith, G. R., Kunes, S. M., Schultz, D. W., Taylor, A., et Triman, K. L. (1981). Structure of chi hotspots of generalized recombination. *Cell* 24, 429-436.
- Smith, M. C. M., et Thorpe, H. M. (2002). Diversity in the serine recombinases. *Mol. Microbiol* 44, 299-307.
- Spiers, A. J., et Sherratt, D. J. (1999). C-terminal interactions between the XerC and XerD site-specific recombinases. *Mol. Microbiol* 32, 1031-1042.
- Spiers, A. J., et Sherratt, D. J. (1997). Relating primary structure to function in the *Escherichia coli* XerD site-specific recombinase. *Mol. Microbiol* 24, 1071-1082.
- Steiner, W. W., et Kuempel, P. L. (1998a). Cell division is required for resolution of dimer chromosomes at the dif locus of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol* 27, 257-268.
- Steiner, W. W., et Kuempel, P. L. (1998b). Sister chromatid exchange frequencies in *Escherichia coli* analyzed by recombination at the dif resolvase site. *J. Bacteriol* 180, 6269-6275.

- Subramanya, H. S., Arciszewska, L. K., Baker, R. A., Bird, L. E., Sherratt, D. J., et Wigley, D. B. (1997). Crystal structure of the site-specific recombinase, XerD. *EMBO J* *16*, 5178-5187.
- Summers, D. K., Beton, C. W., et Withers, H. L. (1993). Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis. *Mol. Microbiol* *8*, 1031-1038.
- Summers, D. K., et Sherratt, D. J. (1984). Multimerization of high copy number plasmids causes instability: CoIE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell* *36*, 1097-1103.
- Thompson, J. F., Moitoso de Vargas, L., Koch, C., Kahmann, R., et Landy, A. (1987). Cellular factors couple recombination with growth phase: characterization of a new component in the lambda site-specific recombination pathway. *Cell* *50*, 901-908.
- Thomsen, N. D., et Berger, J. M. (2009). Running in reverse: the structural basis for translocation polarity in hexameric helicases. *Cell* *139*, 523-534.
- Val, M., Bouvier, M., Campos, J., Sherratt, D., Cornet, F., Mazel, D., et Barre, F. (2005). The single-stranded genome of phage CTX is the form used for integration into the genome of *Vibrio cholerae*. *Mol. Cell* *19*, 559-566.
- Val, M., Kennedy, S. P., El Karoui, M., Bonn e, L., Chevalier, F., et Barre, F. (2008). FtsK-dependent dimer resolution on multiple chromosomes in the pathogen *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet* *4*, e1000201.
- Van Duyne, G. D. (2001). A structural view of cre-loxp site-specific recombination. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* *30*, 87-104.
- Vicente, M., Rico, A. I., Martínez-Arteaga, R., et Mingorance, J. (2006). Septum enlightenment: assembly of bacterial division proteins. *J. Bacteriol* *188*, 19-27.
- Voziyanov, Y., Pathania, S., et Jayaram, M. (1999). A general model for site-specific recombination by the integrase family recombinases. *Nucleic Acids Res* *27*, 930-941.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., et Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* *1*, 945-951.
- Wang, J. C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* *3*, 430-440.
- Wang, L., Yu, Y., He, X., Zhou, X., Deng, Z., Chater, K. F., et Tao, M. (2007). Role of an FtsK-like protein in genetic stability in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol* *189*, 2310-2318.
- Wang, S. C. E., West, L., et Shapiro, L. (2006). The bifunctional FtsK protein mediates chromosome partitioning and cell division in *Caulobacter*. *J. Bacteriol* *188*, 1497-1508.

- Wang, X., Reyes-Lamothe, R., et Sherratt, D. J. (2008). Modulation of *Escherichia coli* sister chromosome cohesion by topoisomerase IV. *Genes Dev* 22, 2426-2433.
- Wu, D., Hugenholtz, P., Mavromatis, K., Pukall, R., Dalin, E., Ivanova, N. N., Kunic, V., Goodwin, L., Wu, M., Tindall, B. J., *et al.* (2009). A phylogeny-driven genomic encyclopaedia of Bacteria and Archaea. *Nature* 462, 1056-1060.
- Yates, J., Aroyo, M., Sherratt, D. J., et Barre, F. (2003). Species specificity in the activation of Xer recombination at *dif* by FtsK. *Mol. Microbiol* 49, 241-249.
- Yates, J., Zhekov, I., Baker, R., Eklund, B., Sherratt, D. J., et Arciszewska, L. K. (2006). Dissection of a functional interaction between the DNA translocase, FtsK, and the XerD recombinase. *Mol. Microbiol* 59, 1754-1766.
- Ye, J., Osborne, A. R., Groll, M., et Rapoport, T. A. (2004). RecA-like motor ATPases-- lessons from structures. *Biochim. Biophys. Acta* 1659, 1-18.
- Yen, M., Lin, N., Hung, C., Choy, K., Weng, S., et Tseng, Y. (2002). *oriC* region and replication termination site, *dif*, of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 17 chromosome. *Appl. Environ. Microbiol* 68, 2924-2933.

Author: Sophie NOLIVOS

Title: Chromosome dimer resolution in Streptococci

Supervisors: François CORNET and Pascal LE BOURGEOIS

ABSTRACT

Most known bacteria harbour a unique circular chromosome. Recombination between sister chromosome during replication may fuse them into a single DNA molecule called a chromosome dimer. Dimers are resolved to monomers by Xer site-specific recombination. In *Escherichia coli* it consists of two recombinases, XerC and XerD acting at a specific *dif* site located in the replication terminus. The Xer recombination system is controlled by the septum associated protein, FtsK. FtsK is a DNA translocase oriented by specific motif of the chromosome, named KOPS. The polarity of the KOPS is skewed and revers at *dif* site, hence FtsK is always directed toward the recombination site. Homolog of XerC, XerD and FtsK proteins, as well as a *dif* site, are found in most bacteria suggesting that the machinery of recombination and its control are well conserved. However, in the Streptococci family of bacteria, dimer resolution uses a single recombinase, XerS, which acts at an atypical *dif* site, *dif_{SL}*.

This manuscript concerns the study of the mechanism and control of Xer recombination in *Lactococcus lactis*, a member of the Streptococci family. In a first part we demonstrate, *in vitro*, that using a single recombinase does not change the mode of binding and recombination at the specific site, by comparison with the “classical” *E. coli* Xer recombination system. Furthermore, we show *in vivo* that the *L. lactis* Xer system is controlled by FtsK but that activation of recombination is achieved by a different mechanism. In a second part, we investigate the orientation of FtsK translocation. We demonstrate, by combining *in silico*, *in vitro* and *in vivo* approaches, that orientation by skew motifs is conserved in *L. lactis* but that the sequence and length of the motif used is different from known systems.

Key words: site specific recombination, tyrosine recombinase, Streptococci, chromosome dimer, DNA translocation, Xer recombination.

AUTEUR : Sophie NOLIVOS

TITRE :

**ETUDE DU MECANISME DE RESOLUTION DES DIMERES DE CHROMOSOME
CHEZ LES STREPTOCOQUES**

DIRECTEURS DE THESE : François CORNET et Pascal LE BOURGEOIS

Soutenue le 17 septembre 2010

RESUME

La majorité des bactéries connues possèdent un unique chromosome circulaire. Lors de la réplication du chromosome, des événements de recombinaison homologue peuvent lier les deux chromosomes frères en une molécule unique, appelée dimère de chromosome. Le système de recombinaison spécifique de site dédié à résoudre les formes dimériques en monomères est le système Xer. Il est composé chez la bactérie modèle *Escherichia coli* de deux recombinases à tyrosine, XerC et XerD, qui agissent sur un site chromosomique unique, *dif*, localisé dans la région du terminus de réplication. Le système de recombinaison Xer est sous le contrôle de la protéine septale FtsK. FtsK est une translocase à ADN qui est dirigée sur le chromosome par des motifs, les KOPS, dont l'orientation s'inverse à *dif*. De ce fait, elle est toujours dirigée vers le site de recombinaison où elle active la machinerie permettant la résolution des dimères de chromosomes. Des homologues des protéines XerC, XerD et FtsK, ainsi qu'un site *dif*, sont retrouvés chez un grand nombre de bactéries, suggérant que la machinerie ainsi que le contrôle de la recombinaison sont conservés. Cependant, chez les Streptocoques, la machinerie de recombinaison implique une seule recombinase, XerS, qui agit sur un site atypique, *dif_{SL}*.

Ce manuscrit concerne l'étude du mécanisme et du contrôle de la recombinaison Xer chez la bactérie *Lactococcus lactis* appartenant à la famille des Streptocoques. Dans une première partie, nous mettons en évidence *in vitro* que l'implication d'une seule recombinase ne modifie pas le mode de fixation et de recombinaison au site, en comparaison au système Xer « classique » d'*E. coli*. D'autre part, nous montrons *in vivo* que le système est contrôlé par la protéine FtsK mais que le mode d'activation de la recombinaison est différent de celui décrit chez *E. coli*. Dans une deuxième partie nous nous intéressons au mode d'orientation de la protéine FtsK de *L.lactis*. Nous mettons en évidence par une combinaison d'approches *in vivo*, *in vitro* et *in silico*, que la reconnaissance de motifs biaisés sur le chromosome est conservée mais que la taille et la séquence du motif reconnu diffère des systèmes déjà décrits.

MOTS CLES : Recombinaison spécifique de site, recombinase à tyrosine, Streptocoques, dimères de chromosome, translocation de l'ADN, recombinaison Xer.

DISCIPLINE : Microbiologie et génétique moléculaires

Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires, UMR5100, CNRS-UPS.
118, route de Narbonne. 31062 Toulouse Cedex 9.