

Université de Montréal

**Caractérisation moléculaire du système de recombinaison XerH/*difH* chez
*Campylobacter jejuni***

Par

Amal Benmohamed

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté

en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M. Sc.)

en microbiologie et immunologie

Août, 2021

© Amal Benmohamed, 2021

Université de Montréal

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

**Caractérisation moléculaire du système de recombinaison XerH/*difH* chez
*Campylobacter jejuni***

Présenté par

Amal Benmohamed

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Marylise Duperthuy
Président-rapporteur

George Szatmari
Directeur de recherche

Philippe Fravalo
Membre du jury

Résumé

Chez les bactéries à chromosomes circulaires, le crossing-over introduit par la recombinaison homologue peut conduire à des échanges de chromatides sœurs. Des nombres impairs de ces échanges aboutissent à la dimérisation des deux chromatides nouvellement répliqués compromettant ainsi leur ségrégation. Par conséquent, la plupart des bactéries utilisent le système de recombinaison spécifique de site Xer pour convertir les dimères de chromosomes et de plasmides en monomères stables.

Ce système comporte deux recombinases de la famille Tyrosine recombinase, XerC et XerD, agissant sur le site *dif*. Cependant, quelques ϵ -protéobactéries n'ont besoin que d'une seule recombinase XerH agissant sur un site *difH*. Il paraît intéressant d'étudier le système de recombinaison XerH de *Campylobacter jejuni*, surtout que l'augmentation spectaculaire de l'incidence de campylobactériose est alarmante. Cette étude vise à mieux comprendre comment la protéine XerH catalyse la réaction de recombinaison au niveau du site *difH* en mettant en évidence les séquences indispensables pour la liaison et le clivage. Grâce à ces expériences, nous avons pu confirmer que XerH est capable de se lier à la séquence entière *difH*; XerH est capable de cliver les deux brins supérieurs et inférieurs de *difH* avec une réaction plus efficace au niveau du brin inférieur; les nucléotides conservés du site de liaison sont indispensables pour la réaction de liaison; la modification de la longueur de l'espaceur améliore la réaction de liaison et de clivage et les modifications apportées au site de clivage prédit ont aboli la réaction de liaison et affecté la réaction de clivage au niveau du brin supérieur et inférieur du site *difH*.

Ces expériences aideront à comprendre comment la recombinase XerH/*difH* contrôle la résolution des dimères chromosomiques chez *Campylobacter jejuni* en identifiant les séquences et les facteurs indispensables pour qu'un certain système soit fiable. Notre étude représente un pas vers l'avant pour comprendre un mécanisme important chez un agent pathogène ayant un grand impact sur la santé publique.

Mots-clés : Recombinaison spécifique de site, XerH, XerC/XerD, *difH*, Tyrosine recombinases, *Campylobacter jejuni*

Abstract

In bacteria with circular chromosomes, cross-over induced by homologous recombination can lead to sister chromatid exchanges, odd numbers of these exchanges result in dimerization of the two newly replicated chromatids compromising their segregation. Therefore, most bacteria use the Xer site-specific recombination system to convert chromosomal and plasmid dimers into stable monomers.

This system involves two recombinases of the Tyrosine recombinase family, XerC and XerD, acting at the *dif* site. However, some ϵ -proteobacteria require only one XerH recombinase acting on a *difH* site. It seems interesting to study the XerH recombination system of *Campylobacter jejuni*, especially since the dramatic increase in the incidence of campylobacteriosis is alarming. This study aims to better understand how the XerH protein catalyzes the recombination reaction at the *difH* site by identifying the sequences required for binding as well as the factors regulating this reaction. As a result of these experiments, we were able to confirm that XerH is able to bind to the entire *difH* sequence; it is able to cleave both the top and bottom strands of *difH* with a more efficient reaction at the bottom strand; The conserved nucleotides in the binding site are essential for the binding reaction, modification of the spacer length improves the binding and cleavage reaction, and modifications in the predicted cleavage site abolished the binding reaction and affected the cleavage reaction at both the top and bottom strands of the *difH* site..

These experiments will help to understand how the XerH/*difH* recombinase controls the resolution of chromosomal dimers in *Campylobacter jejuni* by identifying the essential sequences and factors required for a certain system to be reliable. Our study represents a step forward in understanding an important mechanism in a pathogen with great impact on public health.

Keywords : Site-specific recombination, XerH, XerC/XerD, *difH*, Tyrosine recombinases, *Campylobacter jejuni*.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles et abréviations	xi
Remerciements.....	xvii
Revue de littérature.....	1
Contraintes de circularité du chromosome bactérien et instabilité du génome.....	1
1. Généralités	1
2. Contraintes de circularité du chromosome bactérien.....	2
Résolution des dimères de chromosomes par le système <i>Xer/dif</i>	4
1. Généralités	4
2. Mécanisme de résolution des dimères de chromosomes par Xer	6
3. Intervention de FtsK dans la résolution des dimères de chromosomes	11
Gestion des dimères par les systèmes <i>Xer/dif</i> alternatifs	16
1. Intervention du système Xer dans la résolution des dimères de plasmides	16
2. Les éléments mobiles intégratifs exploitant Xer (IMEXs)	19
3. Le système de recombinaison à une seule recombinaison	26
3.1. Le système <i>XerS/difSL</i>	27
3.2. Le système <i>XerH/difH</i>	28
3.3. Le système <i>XerA/dif</i>	32

3.4. Le système XerH/ <i>difH</i> de <i>Campylobacter jejuni</i>	33
<i>Campylobacter jejuni</i>	36
1. Historique et Taxonomie	36
2. Caractéristiques microbiologiques et biochimiques	37
3. Épidémiologie et prévalence	40
4. Pathogénicité et maladies.....	41
5. Caractéristiques génétiques	42
Problématique et Objectifs	46
Matériel et méthodes	49
Souches bactériennes et plasmides	49
Conditions de croissance bactérienne et manipulation d'ADN	50
Les oligonucléotides	51
Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	53
Mutagenèse dirigée	54
Surexpression et purification des protéines	55
Expériences de retard sur gel (EMSA).....	55
Réactions avec les substrats suicides.....	56
Résultats	58
Activité de liaison de XerH sur les mutants <i>difH</i>	58
1. Mutations introduites dans le site <i>difH</i>	59
2. Modification des sites de liaison.....	61
3. Modification du site de clivage	63
4. Modification de la région centrale.....	65
Activité de XerH sur les substrats suicide <i>difH</i>	68

Activité de XerH sur les demi-sites <i>difH</i>	71
Discussion.....	75
Conclusion et perspectives.....	81
Références bibliographiques	85
Annexe	105

Liste des tableaux

Tableau 1. –	Souches et plasmides utilisés	49
Tableau 2. –	Amorces pour les réactions PCR.....	51
Tableau 3. –	Synthèse des mutations et de leurs effets sur la réaction de liaison et de clivage.	73

Liste des figures

Figure 1. –	Résolution des dimères de chromosomes et décaténation d'une paire de chromosomes	3
Figure 2. –	Les différents produits de la recombinaison spécifique de site.....	5
Figure 3. –	Analyse phylogénétique des recombinases XerC, XerD, XerH et XerS..	8
Figure 4. –	Ségrégation des chromatides sœurs pendant la résolution des dimères de chromosomes chez <i>E. coli</i>	10
Figure 5. –	Représentation des domaines de la protéine FtsK de <i>E.coli</i>	12
Figure 6. –	Résolution de dimères de plasmides	18
Figure 7. –	Alignement des séquences de (A) <i>dif</i> , (B) <i>cer</i> , (C) <i>psi</i> , (D) <i>dif1</i> , (E) <i>attP^{CTX}</i> , (F) <i>attP^{VGJ}</i> , (G) <i>attP^{TLC}</i> (H) <i>difSL</i> et (I) <i>difH</i>	22
Figure 8. –	Arbre phylogénétique des recombinases Xer montrant la distance phylogénique entre les différents systèmes Xer.....	26
Figure 9. –	Alignement des séquences de XerH de <i>Campylobacter jejuni</i> et d'autres recombinases Xer	30
Figure 10. –	Le <i>difH</i> prédit de <i>Campylobacter jejuni</i>	34
Figure 11. –	Représentation des domaines de la protéine FtsK de <i>C.jejuni</i>	35
Figure 12. –	Micrographie électronique à balayage de <i>Campylobacter jejuni</i>	38
Figure 13. –	Représentation circulaire du génome de <i>C. jejuni</i>	43
Figure 14. –	Formation du complexe XerH- <i>difH</i> par EMSA.	58
Figure 15. –	Séquences des mutations introduites dans le site <i>difH</i>	60
Figure 16. –	Effet des mutations introduites au niveau du site de liaison de <i>difH</i>	62
Figure 17. –	–Effet des mutations introduites au niveau du site de clivage de <i>difH</i> (M3, M4 et M5).....	64
Figure 18. –	Effet des mutations introduites au niveau de la région centrale de <i>difH</i> (M6, M7, M8, M9, M10 et M11).....	67
Figure 19. –	Représentation schématique des substrats suicides	68
Figure 20. –	Activité de XerH sur les substrats de suicide.....	69

Figure 21. – Comparaison des produits de clivage entre *difH*-WT et trois mutants de *difH* ...70

Figure 22. – Activité de XerH sur le site complet et les deux moitiés-site droite et gauche du *difH* et des mutants M3, M10 et M11.....72

Liste des sigles et abréviations

ACIDES AMINÉS

D: acide aspartique

E: acide glutamique

A: alanine

R: arginine

N : asparagine

C: cystéine

Q: glutamine

G: glycine

H: histidine

I: isoleucine

L: leucine

K: lysine

M: méthionine

F: phénylalanine

P: proline

S: sérine

T: thréonine

W: tryptophane

UNITÉS DE MESURE

Å: Angström

cm: centimètre

Da: Dalton

°C: degré Celsius

g: gramme

h: heure

kb: kilobase

kDa: kiloDalton

µg: microgramme

µl: microlitre

µM: micromolaire

ml : millilitre

mM : millimolaire

min: minute

ng: nanogramme

pb: paire de bases

rpm: rotation par minute

s: seconde

Y : tyrosine

v/cm: volt par centimètre

ACIDES NUCLÉIQUES

A: Adénine

C: Cytosine

G: Guanine

N: A, G, C ou T

R: Purine

T: Thymine

Y: Pyrimidine

LETTRES GRECQUES

α : alpha

β : beta

γ : gamma

δ : delta

ϵ : epsilon

ϕ : phi

λ : lambda

AUTRES

aa: acides aminés

AAA+: *ATPase associated with various activities*

5'OH: extrémité cinq prime hydroxyle

6-HEX:6-carboxy-2',4,4',5',7,7'hexachlorofluorescine

ADN: acide désoxyribonucléique

ATP: adénosine triphosphate

ATPase: adénosine triphosphatase

BN: *Bottom nick*

C.jejuni : *Campylobacter jejuni*

C-terminal (e): carboxy-terminale

DAZ: *dif activity zone*

dif : *Deletion-Induced Filamentation*

difH:site *dif* de *Campylobacter jejuni*

difSL : site *dif* de *Streptococcus suis*

E.coli : *Escherichia coli*

EDTA: acide éthylènediaminetétracétique

EMSA: *Electrophoretic mobility shift assay*

FITC: isothiocyanate de fluorescéine

HJ: jonction de Holliday

KOPS: *FtsK-orienting polar sequences*

LB: Luria-Bertani

N-terminal (e): amino-terminal

NEB: *New England Biolabs*

PCR: réaction en chaîne par polymérase

SDS: sodium dodecyl sulfate

SOB: *Super Optimal Broth*

TBE: tampon tris-borate EDTA

TDMNG: Tris DTT MgCl₂ NaCl Glycerol

TENG: Tris EDTA NaCl Glycerol

TN: *Top nick*

UV: ultraviolet

Xer: *Chromosomally Encoded Recombinases*

XerH : Xer de *Campylobacter jejuni*

XerS : Xer de *Streptococcus suis*

Cette maîtrise est dédiée à mes précieux parents

Kamel Benmohamed et Naima Zabi

À mes chers frères

Taher et Karim Benmohamed

Remerciements

La réalisation de cette maîtrise fut toute une aventure avec des hauts, des bas et de nombreuses péripéties, une expérience qui a véritablement changé ma vie, et je n'aurais pas pu le faire sans le soutien et les conseils que j'ai reçus de nombreuses personnes.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr. George Szatmari, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son équipe de recherche et pour son soutien inestimable tout au long du projet. Merci George, pour ta disponibilité, ta patience, ton écoute et pour l'appui sur le plan personnel, je vous en suis profondément reconnaissante.

Je tiens à remercier les membres du jury Dre. Marylise Duperthuy et Dr. Philippe Fravallo d'avoir évalué et corrigé mon travail de manière pertinente.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mes frères et plus particulièrement mes parents pour leur amour, leur présence, leur soutien inconditionnel, bien qu'à des milliers de kilomètres, sans votre appui (financier, psychologique, affectif) je n'aurais pas eu la ténacité de compléter ce travail. Merci de continuer à croire en moi, je vous en suis éternellement reconnaissante.

J'adresse également mes plus vifs remerciements à mes amis proches Rim et Nadia pour leur présence et leur soutien infailible qui m'ont permis de persévérer malgré les difficultés. J'ai appris et j'ai grandi de cette expérience et vous avez une grande part de responsabilité dans la réussite de mes projets. Je tiens également à remercier Fabio Castillo qui m'a accompagné, aidé, soutenu et encouragé tout au long de la réalisation de ce mémoire et Ali Farrokhi pour son soutien et son professionnalisme.

Pour conclure, tous ces gens ont été témoins de ma grande affection pour la Tunisie qui alimentait ma recherche. Je remercie mon pays la Tunisie, à travers le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de m'avoir accordé une bourse nationale durant la durée de mes études.

Revue de littérature

Contraintes de circularité du chromosome bactérien et instabilité du génome

1. Généralités

La première démonstration de la nature circulaire du chromosome d'*Escherichia coli* (*E.coli*) a été faite par François Jacob et Elie Wollman dans les années 1960 (1). Depuis ce temps, la richesse des informations acquises par les études génomiques a montré que la circularité des chromosomes constitue un élément standard chez les bactéries et les archées(2). Le plus souvent, les bactéries possèdent un chromosome circulaire unique. Mais certaines d'entre elles en possèdent plusieurs (10% ont plus d'un chromosome qui sont généralement circulaires, mais dans certains cas linéaires)(3–5).

Les chromosomes bactériens sont complexes et dynamiques, deux caractéristiques qui donnent de la flexibilité au génome (6). Ils possèdent une origine de réplication unique *oriC* où la réplication commence. DnaA (protéine impliquée de façon centrale dans l'initiation de la réplication de l'ADN chromosomique et mini-chromosomique sur *oriC* et semble être importante dans le contrôle du timing de l'initiation du cycle cellulaire. Son rôle a été résumé comme étant un facteur de transcription qui, selon l'emplacement du promoteur du gène cible, peut servir comme activateur, répresseur ou terminateur de transcription(7,8)) se lie à cette origine de réplication et stimule l'assemblage du réplisome (une machinerie moléculaire multiprotéique responsable de la réplication de l'ADN. Il est composé de plusieurs protéines spécialisées ayant chacune des activités enzymatiques spécifiques. En particulier, l'hélicase déroulant l'ADN double brin et l'ADN polymérase catalysant la synthèse de l'ADN (9,10)). Au cours de la réplication, les fourches de réplication progressent le long des bras de réplication de manière bidirectionnelle. Cependant, cette réplication est asymétrique. Elle est, en effet, continue sur l'un des deux brins

d'ADN ou « *leading strand* » (celui dans l'orientation 3' → 5') et est discontinue sur le deuxième brin ou « *lagging strand* » (sens 5' → 3') (11). Puisque le chromosome est circulaire, les deux fourches de réplication se rencontrent dans une région terminale située à l'opposé de l'*oriC* et entourée de séquences *ter*. Ces séquences, en conjonction avec la protéine terminatrice de réplication (Tus), arrêtent les fourches de réplication pour synchroniser leur arrivée au même moment et au même endroit(12–15).

2. Contraintes de circularité du chromosome bactérien

Barbara McClintock a été la première à décrire les problèmes de ségrégation dus à la circularité des chromosomes lors de ses études sur la variabilité du maïs (16). Deux menaces topologiques majeures, impliquées dans l'instabilité du génome bactérien et qui visent la ségrégation de l'information génétique, pourraient être causées par la circularité de l'ADN au moment de la division cellulaire : la caténation et la formation de multimères (Figure1)(2). Les caténanes sont deux molécules circulaires entrelacées. Chez *E. coli*, elles sont majoritairement dissociées par l'action d'une topoisomérase de type II, Topo IV, qui introduit une cassure double brin dans l'un des deux segments, pour séparer une molécule de l'autre(17). Cependant, dans le cas des chromosomes circulaires, un nombre impair d'évènements de *crossing-over* provoqué par la recombinaison homologue au niveau des fourches de réplication bloquées ou cassées génère des chromosomes circulaires dimères (18). Ce phénomène se produit environ une fois toutes les six générations (10 à 15 % de la population) chez *E. coli*. Les dimères de chromosomes non résolus empêchent la fermeture correcte du septum de division cellulaire. Dans la plupart des cas ces dimères sont létaux puisqu'ils induisent la filamentation de la bactérie. Les multimères de plasmides non résolus diminuent le nombre de copies indépendamment ségréguées au moment de la division cellulaire ce qui affecte leur stabilité (19–21).

Afin d'assurer une ségrégation chromosomique efficace et une division cellulaire correcte, les bactéries et les archées ont surmonté cette menace majeure par deux principaux mécanismes : le premier consiste à minimiser les événements de *crossing-over*, et le second à régler le problème de formation de dimères (12). La résolution des molécules dimériques est catalysée par la recombinaison spécifique de site par l'action des recombinases, qui sont des enzymes

responsables de la coupure et de la réunion de sites spécifiques sans avoir besoin de synthèse d'ADN ou de cofacteurs à haute énergie : il s'agit du système Xer (*Chromosomally Encoded Recombinases*) qui ajoute un événement de crossing-over, immédiatement avant la division cellulaire, dans une région spécifique appelée *dif* (*Deletion-Induced Filamentation*)(12,22,23).

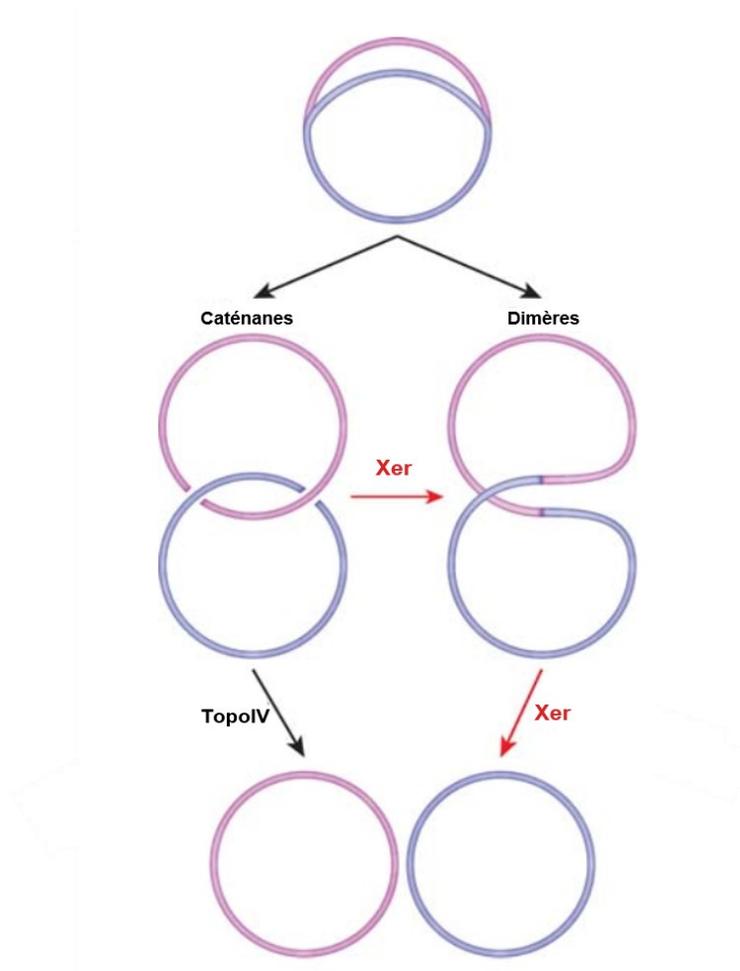


Figure 1. – Résolution des dimères de chromosomes et décaténation d’une paire de chromosomes
(D’après (2))

Les cercles violets et roses représentent les chromosomes frères circulaires. La Topo IV résout les caténanes. Le système Xer résout à la fois les caténanes et les dimères

Résolution des dimères de chromosomes par le système Xer/*dif*

1. Généralités

La recombinaison spécifique de site agit sur de courtes séquences d'ADN spécifiques, appelées sites de recombinaison, où l'échange d'ADN se produit selon trois sortes de réarrangements de l'ADN selon l'orientation et la direction des deux sites de recombinaison (Figure 2) : La recombinaison entre deux sites portés par deux molécules circulaires indépendantes aboutit à leur intégration. La molécule circulaire nouvellement formée porte le site spécifique en deux exemplaires en orientation directe. La réaction de recombinaison inverse entre ces deux sites produit une excision et les deux molécules circulaires initiales sont restaurées (Figure 2A). La recombinaison entre deux sites portés par une seule molécule circulaire dans des orientations opposées produit une inversion (Figure 2B). L'intégration correspond à une réaction intermoléculaire alors que l'excision et les inversions sont des réactions intramoléculaires. Les recombinases spécifiques de site peuvent également catalyser la recombinaison entre deux molécules d'ADN linéaire, ce qui donne naissance à deux molécules d'ADN linéaire chimérique (Figure 2C) (21,22).

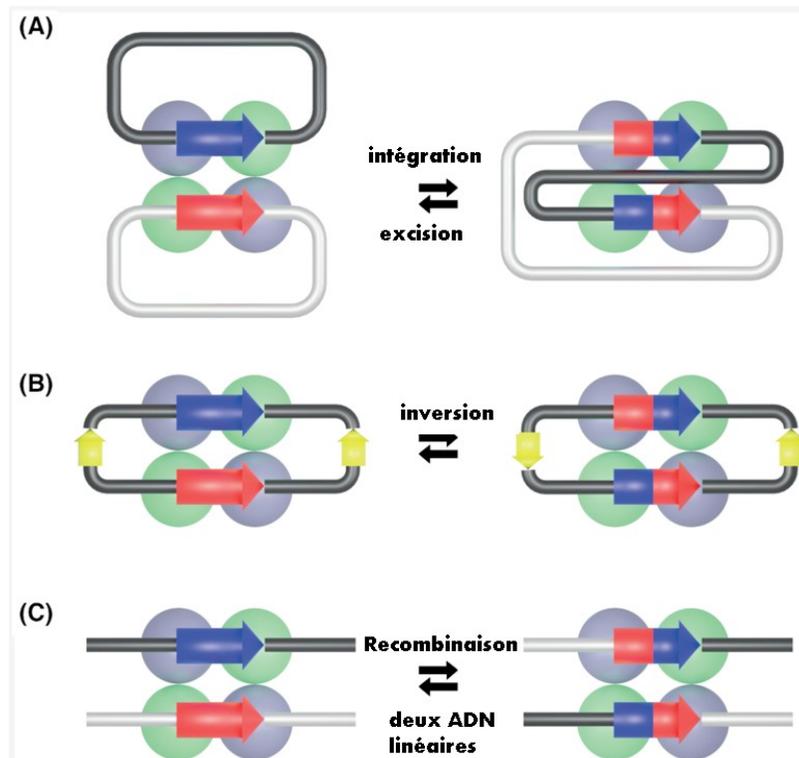


Figure 2. – Les différents produits de la recombinaison spécifique de site. © C. Badel, V. Da Cunha, 2021, reproduit avec permission.

Les rectangles rouges et bleus correspondent aux sites de recombinaison spécifiques. Avec des molécules d'ADN circulaires comme substrats, le résultat de la recombinaison peut être **(A)** l'intégration et l'excision ou **(B)** l'inversion, selon la position relative des deux sites spécifiques. **(C)** La recombinaison entre deux molécules d'ADN linéaire donne lieu à deux molécules d'ADN linéaire chimériques.

Toutes les recombinases spécifiques de site connues sont classées en deux familles non apparentées en fonction du résidu d'acide aminé qui forme une liaison covalente entre la protéine et un phosphate au niveau du site de clivage de l'ADN : les recombinases à tyrosine, également connues sous le nom de la famille des λ intégrases, et les recombinases à sérine, également connues sous le nom de famille des résolvases/invertases. Les membres de ces deux familles sont largement répandus dans les bactéries (23,24).

En premier lieu, les recombinases à tyrosine et à sérine suivent les mêmes étapes au cours de la réaction de recombinaison. Deux monomères d'une recombinase se lient spécifiquement à un

site de recombinaison défini, puis ces deux sites liés sont rassemblés pour former un complexe synaptique tétramérique. La recombinase clive et relie l'ADN, ce qui donne naissance à des sites d'ADN recombinés au sein du complexe synaptique (25,28). Les sérines recombinases, agissent sur un site de recombinaison où seulement 2 pb séparent les sites de clivage des brins supérieurs et inférieurs et les clivages se produisent simultanément pour créer une cassure double brin, tandis que les tyrosines recombinases effectuent un processus de clivage et de jonction en deux étapes là où les sites de clivage sont séparés de 6 à 11 pb. Cependant, les mécanismes employés par les deux familles de recombinases sont très différents. Les recombinases à tyrosine sont divisées selon la directionnalité de la recombinaison : recombinases unidirectionnelles ou bidirectionnelles alors que les sérine recombinases sont divisées en fonction de leur taille : petites ou grandes recombinases. Malgré ces différences, les deux familles de recombinases produisent des produits de recombinaison équivalents et hautement spécifiques et leurs membres sont donc impliqués dans des fonctions biologiques similaires (25,29).

Les recombinases à tyrosine sont généralement présentes chez les procaryotes, mais également chez les archées et même chez les eucaryotes (23). Leur nom vient du fait qu'ils utilisent une tyrosine pour générer une cassure du brin d'ADN, qui est essentielle dans le processus d'échange de brins. Elles se distinguent par un domaine catalytique hautement conservé au niveau de sa séquence et de son repliement et par une moindre identité en dehors du domaine catalytique (22,30,31).

2. Mécanisme de résolution des dimères de chromosomes par Xer

Le mécanisme de résolution des dimères de chromosomes a été initialement identifié en 1984 lors de l'étude de la stabilité du plasmide ColE1 chez *E. coli* (32). Il a été découvert que des multimères de plasmides étaient convertis en monomères afin d'assurer une bonne ségrégation entre les deux cellules filles qui naissent de la division cellulaire. Le gène *xerC* a été identifié chez *E. coli* comme codant la première protéine responsable de la recombinaison spécifique de site sur *cer* lors de la recherche de mutants défectueux pour cette résolution des multimères (33). Quelques années après, une seconde recombinase similaire à XerC, nommée XerD, a été

découverte. Les deux recombinaises fonctionnent généralement en tant qu'hétérotétramère (34). Les recombinaises de la famille Xer peuvent être trouvées chez la majorité des bactéries à chromosomes circulaires (23), et leurs mutations montrent des phénotypes cohérents avec l'incapacité de résoudre les dimères de chromosomes (34,35). En outre, chez certaines espèces, les mutations des gènes *xer* sont associées à des phénotypes inexplicables (par exemple, le manque de viabilité des mutants XerD chez *Staphylococcus aureus*), ce qui suggère que les recombinaises Xer pourraient jouer des rôles supplémentaires dans d'autres processus cellulaires (36). Il est également intéressant de noter que les recombinaises Xer sont les seules recombinaises spécifiques de site identifiées à ce jour qui sont essentielles à la croissance bactérienne et qui ont une fonction clairement associée à la maintenance des chromosomes (37).

La pertinence de ce système pour une bonne ségrégation de chromosomes est soutenue par son haut degré de conservation chez les bactéries et les archées. Le complexe Xer est considéré comme l'une des caractéristiques structurelles les plus conservées dans les cellules contenant des chromosomes circulaires(23,38).

Le processus de recombinaison Xer a été largement étudié chez *E. coli* et est assuré par les deux protéines, appartenant à la famille des recombinaises à tyrosine et étroitement liées (37 % d'identité de séquence), XerC et XerD (34). Les deux protéines font 298 aa chacun et agissent sur une séquence d'ADN de 28 pb (site *dif*), située dans la région *ter*. Le complexe synaptique XerCD/*dif* est formé de deux sous-unités XerC et deux XerD respectivement liées au deux sites *dif* (12). Les orthologues des recombinaises XerC et XerD d'*E. coli* sont facilement identifiés dans le génome de la plupart des bactéries qui portent des chromosomes circulaires. Lorsque c'est le cas, une séquence *dif* peut presque toujours être prédite sur chacun des chromosomes circulaires de la bactérie en fonction de son homologie avec la séquence *dif* d'*E. coli* (5,38). Les gènes *xerC*, *xerD* et *dif* sont invariablement codés dans différentes régions du génome, ce qui suggère que le système Xer est apparu tôt dans l'évolution des bactéries (5,23,38,39). Cependant, le mécanisme de résolution des dimères XerCD/*dif* n'est pas universel, des informations limitées sur la structure de quelques recombinaises à tyrosine ont révélé un repliement du domaine catalytique conservé (40), facilitant l'analyse des données expérimentales et permettant le développement d'un modèle général pour les recombinaises Xer constitué de ; XerD, XerH, XerA, et d'autres

recombinases à tyrosine apparentées comme Cre, l'intégrase HP1, FLP et l'intégrase λ (37,41–49). Ces recombinaisons ne dérivent pas les unes des autres, mais peuvent toutes être regroupées avec XerC et XerD dans l'arbre phylogénétique des tyrosine recombinaisons (Figure 3)(23).

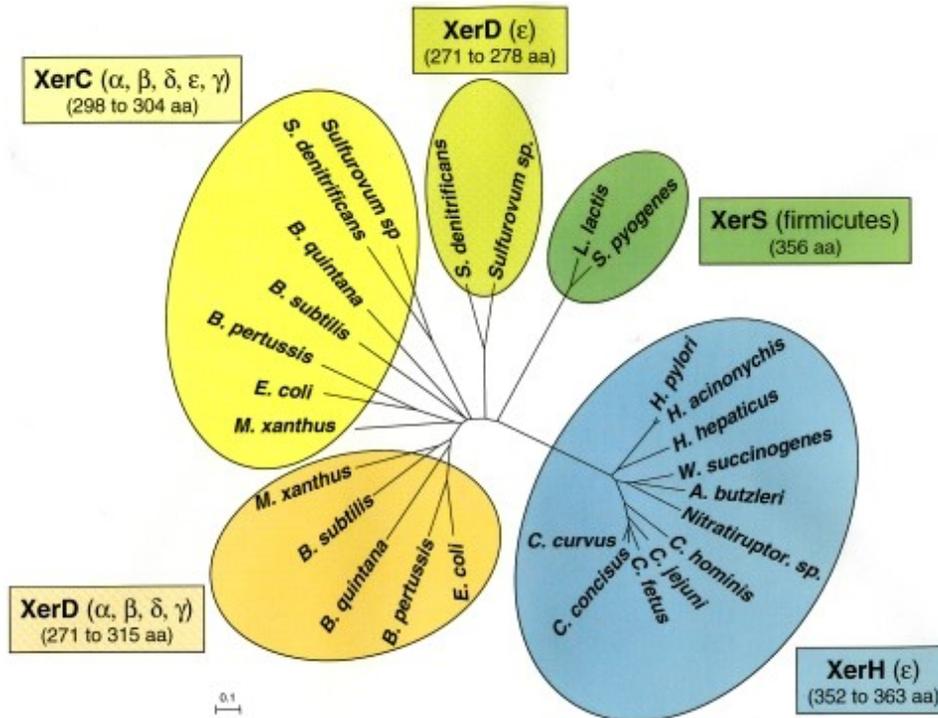


Figure 3. – Analyse phylogénétique des recombinaisons XerC, XerD, XerH et XerS. © C. Carnoy, C.A. Roten, 2009, reproduit avec permission.

La phylogénie a été bâtie en utilisant la méthode « Neighbor-Joining »(50). L'alignement des séquences d'acides aminés (avec Clustal W) et les analyses phylogénétiques ont été réalisés dans MEGA4(51). Les distances évolutives ont été calculées en utilisant la méthode de correction de Poisson. La taille des recombinaisons (en acides aminés) est indiquée sous le nom de la recombinaison, entre parenthèses.

Le site *dif* d'*E. coli* est divisé en deux demi-sites de 11 pb qui partagent une symétrie dyadique partielle, et qui sont reliés par une région centrale de 6 pb qui définit les positions de clivage et d'échange des brins (52). L'étape initiale de la recombinaison spécifique de site effectuée durant la résolution des dimères nécessite la formation d'un complexe synaptique constitué d'un

complexe protéine/ADN tétramérique (quatre protomères de recombinases à tyrosine) et deux duplex de sites de recombinaison. Une fois le complexe synaptique formé, deux protomères opposés et activés clivent le brin d'ADN de chaque duplex du site de recombinaison. Cela se produit lorsque le groupe hydroxyle de la tyrosine nucléophile attaque le phosphate scissile dans la région centrale pour former un intermédiaire 3' phosphotyrosyle et une extrémité 5'-hydroxyle. Cet intermédiaire conserve l'énergie provenant du clivage du lien phosphodiester pour effectuer le premier échange de brin. Le 5'-hydroxyle récemment formé attaque la liaison 3' phosphotyrosyle située sur le site partenaire pour resceller les cassures de brins en créant un intermédiaire de jonction de Holliday (HJ). La formation et l'isomérisation du HJ entraînent l'activation de la seconde paire de sous-unités liée à l'autre moitié des sites de recombinaison et l'inactivation de la première paire de sous-unités. La seconde paire de sous-unités clive alors, échange et rejoint la seconde paire de brins par le même mécanisme que celui précédemment décrit ; ce second clivage permet la résolution de la HJ-intermédiaire et aboutit à la formation de l'ADN recombinant (Figure 4B) (48,53). Ce processus implique que les paires spécifiques de recombinases et/ou les sites actifs sont continuellement activés et désactivés pour synchroniser quand et comment la recombinaison se déroule. Cette coordination dépend des interactions allostériques entre les recombinases et des facteurs externes imposés au complexe synaptique (54–56). En ce qui concerne le système XerCD/*dif*, XerC initie normalement la catalyse d'une paire de brins d'ADN pour former l'intermédiaire HJ sans résolution subséquente par XerD. Par conséquent, les HJ sont rapidement reconvertis pour retrouver le réarrangement d'origine de l'ADN. Cette première interaction avec XerC est fonctionnellement active lors de l'intégration de certains bactériophages qui utilisent la recombinaison Xer pour intégrer leurs génomes dans le site *dif* de leurs hôtes ou lors de la résolution de multimères de plasmides. En revanche, au cours de la résolution des dimères de chromosomes, les complexes XerCD/*dif* pré-synapsés favorisent l'activation de XerD par la protéine FtsK pour assurer la médiation de l'échange du premier brin, générant un intermédiaire transitoire (XerD-HJ), une isomérisation ultérieure forme un intermédiaire XerC-HJ qui est rapidement résolu en ADN recombinant par XerC (Figure 4A)(57,58).

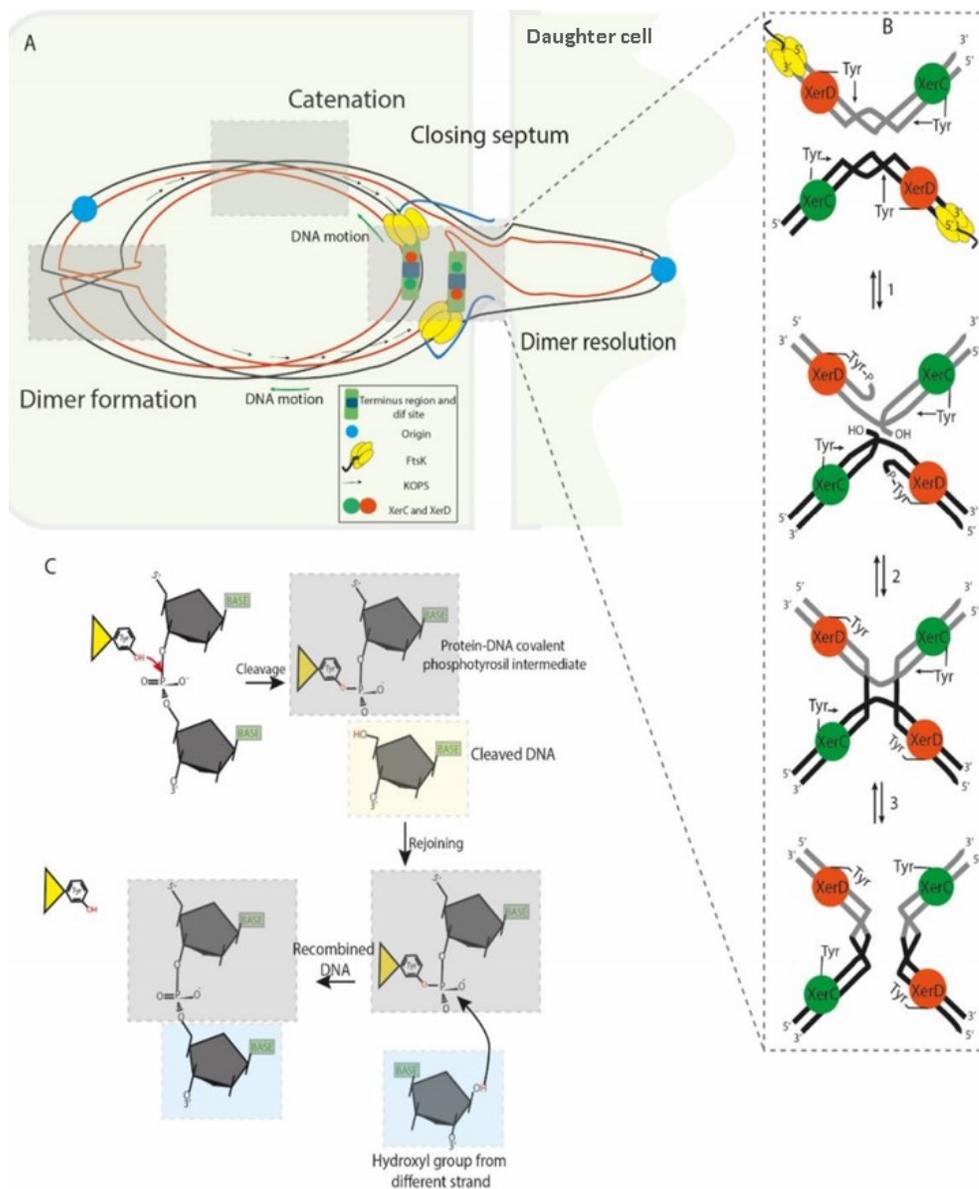


Figure 4. – Ségrégation des chromatides sœurs pendant la résolution des dimères de chromosomes chez *E. coli*. © F. Castillo, A. Benmohamed, G. Szatmari, 2017, reproduit avec permission.

L'illustration représente la partie centrale d'une cellule en division lors des étapes finales de la ségrégation des chromosomes. (A) La fermeture du septum de division, le domaine moteur $\alpha\beta$ de FtsK_C (anneau hexamérique jaune), le domaine de liaison non structuré FtsK_L (ruban bleu), les séquences KOPS et le complexe synaptique XerCD/*dif* sont indiqués. La concaténation empêche la migration correcte de la

chaîne d'ADN naissante ; les régions d'origine se déplacent vers leurs pôles cellulaires respectifs, mais le reste de l'ADN noué est étiré à travers et derrière le septum. (B) FtsK_C se charge sur les séquences KOPS de manière orientée et se transloque vers les complexes XerCD/*dif*. La translocation de FtsK lui permet d'atteindre les complexes XerCD/*dif* et de les amener à proximité ; en conséquence, le sous-domaine γ de la région FtsK_C active XerD (sphère orange) pour effectuer le clivage du premier brin. Ensuite, XerC (sphère verte) effectue le clivage du second brin, permettant la séparation des chromatides sœurs. (C) Illustration du mécanisme de recombinaison spécifique de site utilisé par les recombinases à tyrosine : Le groupe OH du résidu tyrosine actif attaque le phosphate scissile formant un intermédiaire 3'-covalent enzyme phosphotyrosyl-ADN et une extrémité 5'-hydroxyle libre. L'intermédiaire covalent est attaqué à son tour par l'autre extrémité 5'- pour inverser la réaction de clivage et obtenir un produit recombinant.

3. Intervention de FtsK dans la résolution des dimères de chromosomes

La ségrégation des chromosomes bactériens est régulée par de nombreux processus qui agissent à différents stades de la division cellulaire et au niveau de différentes régions du chromosome. Les bactéries possèdent des mécanismes de régulation qui garantissent que la formation du septum ne se produit qu'après l'élimination correcte des chromosomes du site de division(59–62). Néanmoins, il arrive que, dans certaines situations, notamment lorsque des dimères de chromosomes sont formés, le septum commence à s'assembler sur de l'ADN non ségrégué. Pour garantir que tout le matériel génétique est correctement évacué du site de division avant la fermeture du septum, les bactéries comptent sur l'action des ADN translocases (63), telle que la protéine FtsK.

FtsK (Filamentous Temperature-Sensitive cell division protein K), codée par un gène essentiel, le gène *ftsK*, est une protéine multifonctionnelle de 1329 acides aminés (chez *E.coli*)(Figure 5). Elle fait partie de la superfamille des AAA+ (*ATPase Associated with various Activities*) et plus particulièrement de la sous-famille des translocases d'ADN double brin FtsK/SpoIIIE/TraSA (64,65). Il s'agit d'une translocase d'ADN associée au septum de division, qui coordonne la ségrégation de chromosomes et la division cellulaire lorsque l'organisation chromosomique est

affectée (par exemple, formation de dimères de chromosomes, décaténation ou retard de réplication)(57,66–71).



Figure 5. – Représentation des domaines de la protéine FtsK de *E.coli* (D'après (72))

Les hélices transmembranaires du domaine N-terminal transmembranaire sont indiquées en bleu. Le domaine hélicase d'ATP C-terminal (FtsK_C) est constitué de trois sous-domaines α (jaune), β (orange), et γ (rouge).

La FtsK a été identifiée pour la première fois en 1995 grâce à des observations faites sur des cellules mutantes thermosensibles d'*E. coli* TOE44 (AB2497 *ftsK44*) qui avaient la capacité de former de longues chaînes cellulaires en raison de la substitution d'un seul acide aminé dans le domaine N-terminal (FtsK_N). À cette époque, la FtsK était considérée comme participante à la formation des septums en tant qu'enzyme responsable de la modification du peptidoglycane(73). En 1998, Yu et al. ont démontré que l'inactivation de la région C-terminale de FtsK affectait la ségrégation chromosomique normale, ce qui cause la formation de longues chaînes cellulaires et ils ont détecté une répartition anormale de l'ADN dans certains mutants doubles *ftsK1::cat minB* de minicellules d'*E. coli* (74). Enfin, Steiner et al. (1999) ont découvert que la recombinaison spécifique de site au niveau du site *dif* nécessite la présence de FtsK_C et que la résolution des dimères de chromosomes ne peut donc avoir lieu qu'en sa présence(75).

Les ADN translocases FtsK/SpoIIIE ont une structure commune en trois domaines (76) : un domaine N-terminal situé au niveau de la membrane, une région carboxy-terminale soluble et un

linker central de longueur variable qui relie les domaines N- et C-terminaux. Le domaine N-terminal peu conservé joue souvent le rôle de médiateur de fonctions non liées à la translocation de l'ADN, tandis que le domaine C-terminal forme un moteur de pompage, dépendant de l'ATP, de l'ADN (54,77–79).

Le domaine N-terminal (FtsK_N ~ 279aa) est responsable de la fixation de la protéine à la membrane par le biais de quatre segments transmembranaires (Figure 5) (80,81). Il sert à localiser la protéine au niveau du septum et fait partie du divisome (le complexe multiprotéique qui orchestre la division cellulaire). Les cellules exprimant seulement FtsK_N peuvent survivre, cependant, en absence de ce domaine, la machinerie de division ne peut pas s'assembler correctement au niveau de septum et par conséquent, les cellules présenteront un phénotype de filamentation typique des cellules *E. coli* incapables de se diviser (74,82,83).

Le domaine de liaison FtsK (FtsK_L) peu conservé chez les homologues de FtsK, s'étend du septum vers le cytoplasme, séparant FtsK_N du domaine soluble C-terminal (FtsK_C) (Figure 5). Sa longueur et sa composition varient selon les espèces, étant de ~650 acides aminés chez *E. coli* et la plupart des Protéobactéries, de ~200aa chez les *Vibrios* ou de ~125aa chez *Pseudomonas* (79,84,85). Ce *linker* était initialement considéré comme un simple espaceur, cependant, il est maintenant connu comme étant un élément nécessaire à l'établissement d'interactions essentielles entre FtsK et plusieurs autres composants du divisome. Les expériences réalisées par Bigot et al. (2004) ont démontré que les mutations *ftsK_L* augmentaient les phénotypes de filamentation de manière encore plus importante que les mutants *xer* et que cette formation filamenteuse ne correspondait pas à des problèmes de résolution des dimères de chromosomes. Au contraire, on pensait qu'elle était due à un positionnement déficient de la protéine, réduisant la possibilité de contact entre FtsK_C et la région DAZ (*dif* Activation Zone) du chromosome(86). Par la suite, Dubarry et al. (2010) ont révélé que différentes parties du domaine *linker* interagissent avec d'autres protéines du divisome telles que FtsQ, L, I et Z et que ces interactions contribuent à stabiliser l'ensemble du divisome au niveau du site de septation(84). Il est intéressant de noter qu'il a également été suggéré que le domaine FtsK_L peut arrêter ou ralentir la division cellulaire pendant la résolution des dimères en raison de la déstabilisation des composants du divisome quand la protéine FtsK_C

est attirée par l'ADN pendant la translocation, cette force peut séparer FtsZ et retarder la constriction du septum (76).

En aval du *linker* se trouve le domaine FtsK_C de ~500aa, hautement conservé chez la famille des ADN translocases et contient le moteur de translocation impliqué dans la ségrégation des chromosomes. Contrairement aux deux autres domaines, la région FtsK_C soluble n'est pas nécessaire à la synthèse du septum. En revanche, elle joue des rôles importants pour promouvoir la résolution des dimères de chromosomes et écarter l'ADN du site de constriction (75,87,88). Chez *E.coli*, les délétions du domaine C-terminal entraînent l'apparition d'un phénotype correspondant à l'incapacité de résoudre les dimères de chromosomes (39,75). Conformément à ce phénotype, le domaine hélicase C-terminal FtsK_C s'est avéré suffisant *in vivo* et *in vitro* pour assurer la recombinaison XerC/D au niveau du site *dif* d'*E.coli* (54,89).

La FtsK_C peut être subdivisée en trois sous-domaines séparés appelés α , β et γ (Figure 5) (90). Les domaines α et β forment l'anneau principal de l'hélicase et ils sont considérés comme le moteur de translocation en pompant l'ADN, alors que le domaine γ se révèle important pour la liaison de l'ADN et les interactions avec les recombinases Xer (79). D'autres études chez *E.coli* ont indiqué que seul le sous-domaine γ est nécessaire pour activer le clivage de XerD *in vitro* et *in vivo*, tandis que les sous-domaines α et β sont nécessaires pour maintenir la topologie correcte de l'ADN pendant la recombinaison XerC/D (69).

Afin de s'assurer que pendant la recombinaison XerC/D au niveau du site *dif* chromosomique d'*E.coli*, seuls les produits de recombinaison souhaités sont produits, des paires spécifiques de monomères situés dans le complexe de recombinaison doivent être séquentiellement actives. Ceci est réalisé par l'activation spécifique de XerD par FtsK. Cette dernière est essentielle pour la division cellulaire chez *E.coli*, même si sa fonction dans la recombinaison Xer diffère selon les espèces bactériennes (91). De plus, l'interaction entre FtsK et XerD est considérée comme spécifique d'espèce, car l'homologue FtsK de *Haemophilus influenza* ne supporte pas la recombinaison XerC/D chez *E.coli* et vice versa (90).

Le mécanisme de régulation exact de la recombinaison XerC/D par la protéine FtsK au niveau du site *dif* demeure mal connu. Il a été proposé que FtsK est guidée vers *dif* par des séquences

polaires orientant, les KOPS (*FtsK-Orienting Polar Sequences*). Les KOPS sont des répétitions d'ADN octamériques qui présentent une orientation biaisée dans une seule direction, avec un changement d'orientation dans la région terminale de réplication comme si elle pointait vers le site *dif* (92). FtsK se lie aux KOPS et, en raison de leur polarité, le domaine hélicase déplace l'ADN jusqu'à ce qu'il rencontre un site *dif* (Figure 4A)(68,93). Puisque FtsK est ancré au septum grâce à son domaine N-terminal, cela permet d'amener deux sites *dif*, un de chaque chromosome fille, vers le septum de division. À ce stade, les sites *dif* sont considérés comme étant liés chacun par un hétérodimère XerC/D et synapsés dans une conformation qui ne permet que le clivage improductif, la formation de HJ et sa résolution en substrats de pré-recombinaison par les monomères XerC (89).

Grâce à un mécanisme inconnu, l'interaction avec FtsKy remodèle le complexe synaptique pour permettre le clivage par XerD et la recombinaison productive peut alors avoir lieu. Dans l'ensemble, la régulation de la recombinaison XerCD/*dif* par FtsK assure l'unidirectionnalité du processus, le couplage spatial et temporel étroit de la division cellulaire avec la résolution du dimère de chromosome, et la localisation correcte du chromosome pour la ségrégation du génome après la recombinaison(72).

Il a été démontré que FtsK est la plus rapide des ADN translocases connues, atteignant des niveaux de $17,5 \pm 3,5$ kb/s à 37 °C et présentant une force de l'ordre de 60 pN. En outre, cette protéine a démontré une étonnante capacité à déplacer, évincer ou contourner différents obstacles, en particulier les protéines liées à l'ADN telles que les ARN polymérases(65,68,94–96). De manière pertinente, May et al. (2015) ont démontré que la recombinaison du complexe synaptique XerCD/*dif* prend une seconde de plus que le temps de dissociation de FtsK (97). Par conséquent, ils ont suggéré que ce laps de temps peut fournir un contrôle régulateur pour la résolution des dimères, car les chromosomes concaténés reformeront les complexes synaptiques XerCD/*dif* chaque fois que la résolution échouera. Ainsi, de multiples ensembles d'hexamères FtsK entrant en collision à plusieurs reprises avec les complexes synaptiques XerCD/*dif* augmenteront la probabilité de générer des produits recombinants. Ce mécanisme de régulation garantit la formation de produits monomères pendant la translocation de l'ADN endommagé(12,97).

Gestion des dimères par les systèmes Xer/*dif* alternatifs

1. Intervention du système Xer dans la résolution des dimères de plasmides

Tout comme pour les chromosomes circulaires, la recombinaison homologe peut entraîner la multimérisation des plasmides et des autres ADN circulaires si un nombre impair de *crossing-over* se produit entre les deux brins néo-répliqués. La formation du multimère a un impact sur tous les plasmides à faible nombre de copies, car ils interfèrent avec le système de partition et compromettent ainsi la transmission verticale des plasmides. Cela a également un impact sur les plasmides à nombre élevé de copies, car un dimère a deux fois plus de chances de se répliquer et les formes multimères se retrouvent donc accumulées dans la cellule. Par conséquent, la dimérisation des plasmides et leur multimérisation éventuelle ont été appelées la "catastrophe des dimères", à cause de leur effet destructeur sur les populations cellulaires (98,99). La catastrophe des dimères représente deux problèmes majeurs chez les bactéries : premièrement, la distribution inégale des plasmides entre les populations, en particulier les plasmides multicopies qui sont plus vulnérables à la perte de plasmides et deuxièmement la lourde charge métabolique causée par l'accumulation rapide de dimères dans l'hôte (98,100). Comme indiqué précédemment, une étude menée sur la stabilité du plasmide ColE1 présent dans *E.coli* a conduit à la découverte du gène *xerC* au cours d'un crible génétique qui visait à identifier la recombinase utilisée par ColE1 pour la résolution des multimères de plasmides. Des recherches ultérieures sur ColE1 et pSC101 ont permis de mieux comprendre ce système et ont conduit à l'identification des enzymes qui participent à la résolution des dimères par recombinaison spécifique de site dans d'autres plasmides d'*E. coli* et d'autres bactéries(33).

De nombreux plasmides et phages disposent de leur propre mécanisme de recombinaison spécifique pour résoudre ces multimères, comme le phage P1 avec ses recombinases Cre, ou les recombinases Mrpa du plasmide SCP2 présent dans *Streptomyces coelicolor*(101,102). La plupart du temps, ces recombinases sont similaires aux résolvasés ou aux intégrases. Cependant, certains

petits plasmides, comme ceux de la famille ColE1 et pSC101, ne possèdent pas leur propre machinerie de résolution de multimères de plasmides et font appel au système de résolution des dimères codé par le chromosome de leur hôte, le système Xer (103,104). Ces découvertes ont marqué une nouvelle méthode d'action des recombinases spécifiques de site et de leur rôle dans la résolution des dimères. Les méthodes actuelles ont permis d'identifier plus de 1300 recombinases à tyrosine, dont beaucoup sont associées à d'autres protéines hôtes pour réguler leur activité, leur directionnalité ou leur processivité (48).

Deux exemples importants de la résolution des dimères de plasmides par recombinaison XerC/D proviennent du plasmide ColE1, avec son site de recombinaison *cer* (32,33), et du plasmide pSC101, avec son site *psi* (105) qui sont comparables au site *dif* (avec des séquences de fixation pour XerC et XerD mais des régions centrales différentes)(Figure 7). Les deux sites sont d'environ 150-180bp et chacun est présent en une seule copie dans le plasmide respectif (18,105–107). Deux protéines supplémentaires agissent avec XerC/D pour catalyser les réactions de recombinaison spécifiques de site : au niveau du site *cer*, il s'agit du répresseur d'arginine (ArgR) (une protéine de liaison à l'ADN dépendante de l'arginine, initialement appelée XerA) (108–110), et l'aminopeptidase A (PepA) (une protéine bifonctionnelle régulatrice de transcription qui réagit aux signaux environnementaux, qui était précédemment appelée XerB) (111), alors que pour le site *psi*, on parle des deux protéines PepA et ArcA (régulateur transcriptionnel impliqué dans la régulation de la réponse anaérobie) (106,107). Les deux protéines accessoires sont indispensables à la recombinaison des deux sites *cer* et *psi*, car en leur absence, la résolution des dimères de plasmides ne peut pas être achevée. Cependant, à des concentrations anormalement élevées de PepA, la recombinaison *in vitro* peut se dérouler sans l'aide d'ArgR pour *cer* ni d'ArcA pour *psi* (105,106,112,113).

Il a été démontré que les protéines accessoires assurent l'assemblage d'un complexe synaptique où elles s'enroulent avec un nombre très précis de fois autour des séquences accessoires des deux sites (114,115). Dans une telle situation, les recombinases agissent très efficacement sur les sites *cer* et *psi* en créant des produits de recombinaison avec une topologie particulière (Figure 6). Il est particulièrement facile d'assembler un tel complexe, car les sites *psi* sont en orientation directe sur la même molécule d'ADN. Cette topologie adoptée par le complexe nucléoprotéique

donne une directionnalité à la réaction de recombinaison. Cela permet à XerC de réaliser l'échange du premier brin et de favoriser la résolution par recombinaison intramoléculaire (111,116). Ce phénomène est connu sous le nom de sélectivité de résolution ou de filtre topologique (Figure 6).

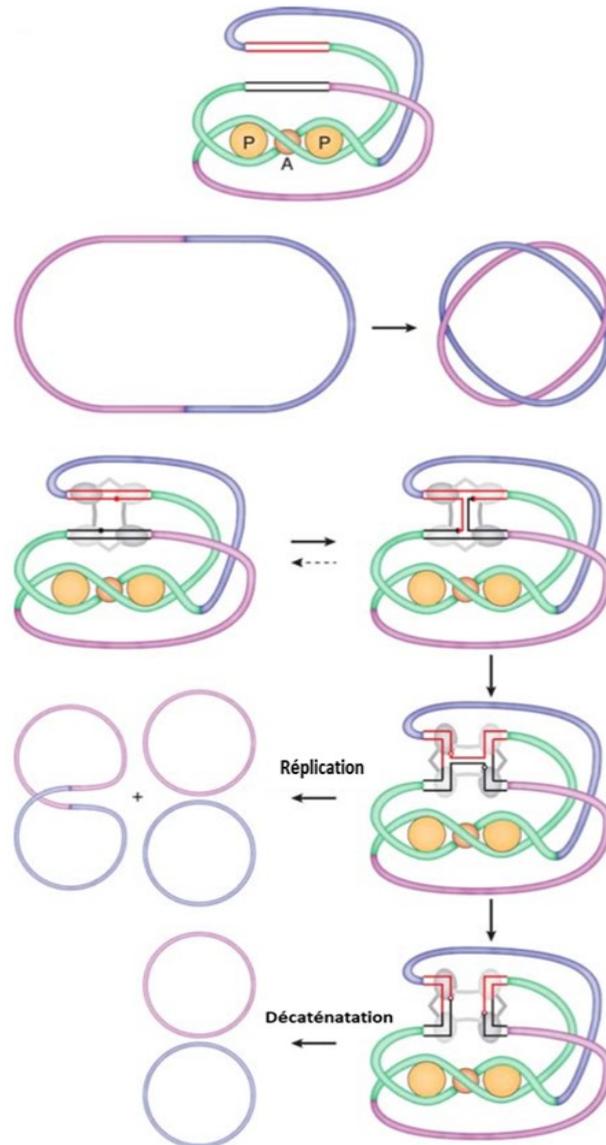


Figure 6. – Résolution de dimères de plasmides (D’après (2))

Représentation schématique du filtre topologique exercé par PepA (P) et ArgR ou ArcA (A) lors de la résolution des dimères de plasmides. Les cercles orange représentent les protéines accessoires. Les traits verts représentent les séquences accessoires. En violet et en rose sont représentés les deux monomères

plasmidiques. Dans le cas de *cer* (Réplication) la réaction est bloquée à la HJ. Dans le cas de *psi* (Décaténation) un double échange de brins est réalisé.

Bien qu'un tétramère de recombinases XerC et XerD soit nécessaire pour la résolution des dimères de plasmides dans *psi* et *cer*, l'activité catalytique de XerD n'est nécessaire que pour *psi* (les échanges de brins sont catalysés par XerC seulement chez *cer*). Dans une telle configuration de synapse, la recombinase XerC est active et effectue le premier échange de brins menant à l'apparition de l'intermédiaire de recombinaison, la HJ (Figure 6)(34,106). Concernant *psi*, la HJ produite après la catalyse de XerC au niveau du brin supérieur est résolue par XerD au niveau du brin inférieur de manière indépendante de la protéine FtsK (105,106,117). La capacité du site *psi* à activer XerD suggère que la synapse est donc légèrement différente de *cer*. Ce qui est le plus intéressant, c'est que l'inversion des sites *psi* entraîne une recombinaison initiée par XerD et que l'échange du second brin est effectué par XerC (116). Ainsi, il se peut que l'ordre d'échange des brins puisse être modifié par des contraintes topologiques qui déterminent quelle recombinase sera active dans la synapse. Cependant, en ce qui concerne *cer*, la résolution de la HJ est assurée par des processus réplicatifs du même type que ceux proposés pour l'intégration des intégrons. En effet, au niveau du *cer*, XerD n'est pas capable de résoudre ce HJ en un produit. Donc le passage de la fourche de réplication va résoudre partiellement ce dimère, produisant un produit monomère et un autre dimère (Figure 6) (106,118,119).

2. Les éléments mobiles intégratifs exploitant Xer (IMEXs)

Bien que le rôle essentiel des recombinases Xer soit de résoudre les dimères de chromosomes et de plasmides (en particulier XerC et XerD), leur haute conservation sur les chromosomes bactériens a clairement permis leur exploitation par d'autres réplicons tels que les plasmides, les divers phages, les éléments cryptiques et même des îlots de pathogénicité (120–122). Ces éléments génétiques mobiles ont été regroupés sous le nom IMEXs (*Integrative Mobile Elements exploiting Xer*) (123).

Les IMEXs sont trouvés intégrés dans le génome de nombreuses bactéries, notamment les entérobactéries comme *E. coli* et *Yersinia pestis*, les Xanthomonadaceae comme *X. campestris* et *Xylella fastidiosa*, les Neisseriaceae comme *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis* et Vibrionaceae comme *Vibrio cholerae* (124–129). Les exemples les plus connus sont les IMEXs de *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*) : le phage à l'origine de la pathogénicité CTX ϕ (Cholera Toxin Phage), le phage participant à l'évolution de la pathogénicité VGJ ϕ (Vibrio Guillermo Javier filamentous phage) et TLC ϕ (Toxic Linked Cryptic) dont le rôle est toujours indéterminé. Ces IMEXs portent des déterminants cruciaux de virulence(2,123,130,131). Ces trois vibriophages possèdent un site d'attachement particulier (*attP*) et un site de type *dif* qui sert à classer les trois différents groupes d'IMEXs, (type CTX ϕ , type VGJ ϕ et type TLC ϕ) (123).

Chacun de ces éléments est capable de exploiter la machinerie de recombinaison bactérienne Xer pour intégrer son génome dans le chromosome bactérien et d'outre passer les mécanismes de contrôle en utilisant les sites de liaison Xer autonomes. Les IMEXs sont classés en plusieurs catégories selon leurs sites de recombinaison et leurs différentes stratégies de détournement de la machinerie Xer. Des homologues de XerC/XerD ont été identifiés chez *V. cholerae*, appelés XerC_{VC} et XerD_{VC} avec 53% et 68% de similarité d'acides aminés avec XerC et XerD de *E. coli*, respectivement (122,132). De plus, des séquences semblables à celles de *dif* sont présentes sur les deux chromosomes (*dif1* & *dif2*)(38,84). Il est intéressant de noter que les deux sites *dif* diffèrent les uns des autres au niveau de leurs séquences, *dif2* contient cinq nucléotides différents par rapport à *dif1* et par rapport à la plupart des sites *dif* des α -protéobactéries, quatre d'entre eux se trouvant dans la région centrale. Bien que les composants pour intégrer leurs génomes soient très similaires, les mécanismes d'intégration des IMEXs diffèrent les uns des autres et de leurs souches hôtes(38).

L'intégration directe de l'ADN simple brin par les phages filamenteux de type CTX ϕ est caractérisée par la formation d'une structure pliée d'environ 150 pb créée par l'interaction d'appariement de bases intra-brin entre deux sites *attP* palindromiques (*attP1* & *attP2*) séparés de 90 nt sur la séquence d'ADN simple brin (Figure 7E) (133). Un manque d'homologie a été remarqué au niveau de la séquence près du bras XerD entre le site *attP* et les sites *dif1* et *dif2*. Ce manque d'homologie entre le site de reconnaissance de XerD_{VC} et *attP*_{CTX ϕ} limite la réaction

catalytique à XerC_{VC} qui catalyse la réaction complète et empêche la résolution de la HJ par XerD_{VC}. Un facteur hôte supplémentaire appelé EndoIII participe à la directionnalité de la réaction, bloquant d'autres cycles de clivage de brin par XerC_{VC}, provoquant sa dissociation et empêchant ainsi l'excision de CTXφ (130). Bien que XerD_{VC} ne soit pas impliqué dans la réaction catalytique, il est tout de même nécessaire pour une intégration réussie, probablement par son rôle dans la formation du complexe synaptique (131). Une fois l'intégration achevée, les protéines de réplication de l'ADN hôte résolvent l'intermédiaire HJ formé et le convertissent en ADN double brin. Le prophage CTXφ ne peut pas être excisé de son hôte, car il perd la capacité de se replier, qui, à son tour, empêche d'autres nouvelles interactions d'appariement de bases entre les sites *attP*, ce qui abolit finalement la réaction catalytique XerC_{VC} (133). Il est intéressant de noter que l'intégration de CTXφ dans les souches *El Tor* ne se trouve que dans chrI (le chromosome ancestral I de *V. cholerae*), et qu'elle est généralement associée à deux autres vibriophages, TLCφ et RS1, qui permettent l'intégration de CTXφ dans le génome de *V. cholerae* en reconstituant un site *dif* fonctionnel, et en favorisant la réplication et la transmission de CTXφ (121). Dans les souches de biotype « classique », CTXφ cible généralement les deux chromosomes (chrI et II) (134).

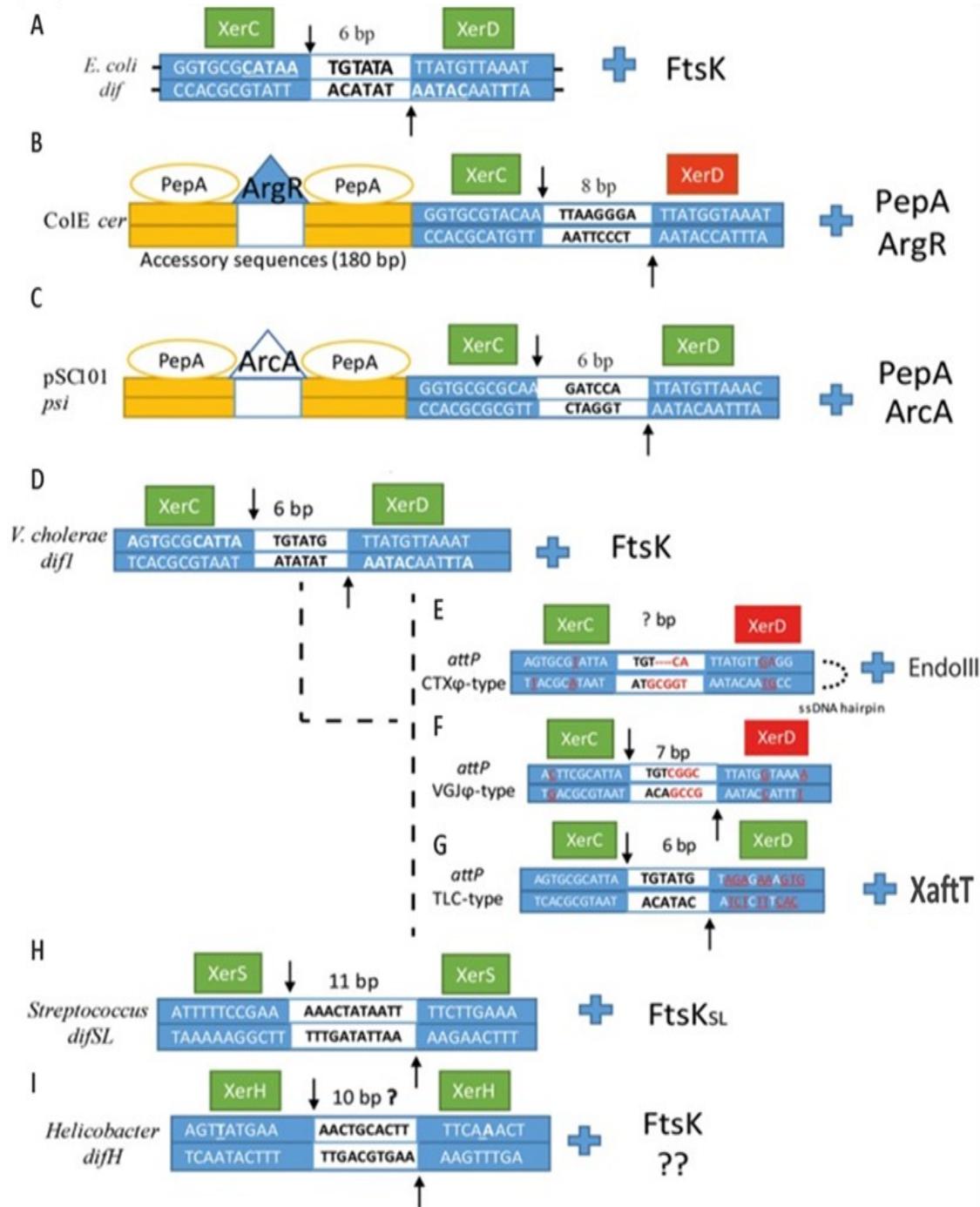


Figure 7. – Alignement des séquences de (A) *dif*, (B) *cer*, (C) *psi*, (D) *dif1*, (E) *attP^{CTX}*, (F) *attP^{VGJ}*, (G) *attP^{TLC}* (H) *difSL* et (I) *difH* (D’après (12))

Les bases des dyades dans chaque bras sont soulignées dans *dif*. Les points de clivage de XerC et XerD sont indiqués par des flèches, la région centrale est représentée au milieu de la séquence comme une boîte blanche avec le nombre de paires de bases correspondant à chaque site *dif* au-dessus. Les bras

gauche et droit sont représentés par des boîtes bleues avec les séquences correspondantes pour chaque site *dif*. L'unité catalytique est représentée par une boîte verte, tandis que l'unité inactivée est représentée par une boîte rouge. Pour (D-G), les bases qui diffèrent de *dif1* dans *V. cholerae* sont soulignées et colorées en rouge. À côté de chaque alignement de *dif* se trouve la protéine accessoire correspondante qui coordonne/active la résolution du dimère.

De la même manière que CTX ϕ , l'intégration du phage VGJ ϕ s'effectue grâce à l'échange de paire de brins effectuée par XerC_{VC}, mais contrairement à CTX ϕ , elle ne possède qu'un seul site d'attachement de type *dif* (*attP*_{VGJ ϕ}) de 29 pb, similaire au site *dif1* et constitué de deux bras de fixation de XerC_{VC} et XerD_{VC} séparés par une région centrale de 7 pb qui permet son intégration dans le chromosome sous forme d'ADN double brin(135). La région centrale de *attP*_{VGJ ϕ} contient quatre nucléotides différents proches du côté de la liaison XerD_{VC} par rapport à la région centrale du site *dif1* (Figure 7F). L'absence d'homologie du côté de la région centrale de XerD_{VC} empêche sa participation à la réaction catalytique. Une fois intégré, le prophage VGJ ϕ acquiert deux sites *attP* (*attP*_L et *attP*_R), également fonctionnels pour la réaction d'excision XerC_{VC}, contrairement à CTX ϕ , où ce sont les recombinases Xer qui peuvent traiter l'excision de VGJ ϕ du génome de l'hôte.

TLC ϕ (*Toxin-linked cryptic*) a été initialement décrit comme un plasmide cryptique existant en faible nombre de copies. En plus de la forme cytoplasmique, plusieurs copies de TLC ϕ sont intégrées en tandem dans le chromosome à proximité du site *dif1*. Ce n'est que récemment que TLC ϕ a été considéré comme un phage satellite intégratif et ce n'est qu'à partir de 2010 que TLC ϕ a été identifié comme un IMEX. Après cette découverte, d'autres éléments mobiles avec un site similaire à celui de TLC ϕ ont été identifiés. Les IMEXs de type TLC ϕ ont un site d'attachement *attP* qui est présent sur le génome double brin de l'élément. La région centrale du site de recombinaison est totalement identique au site *dif* cible mais ne contient pas de bras *dif* XerD_{VC} comme dans le cas des IMEX de type CTX ϕ ou VGJ ϕ (123,136). Avant 2017, le mécanisme de recombinaison des éléments de type TLC ϕ n'était pas bien connu. Midonet et al. (2019) ont démontré que l'élément TLC ϕ utilise une voie de recombinaison où l'échange du premier brin est catalysé par XerD_{VC} et indépendante de FtsK. Un nouveau facteur phagique qui permet à TLC ϕ de contourner le contrôle de FtsK sur l'activation de XerD_{VC}, a été identifié : le facteur XaT qui

interagit spécifiquement avec XerD_{vc}. Il a également été montré que les (IMEXs) codant pour une protéine similaire à XafT sont répandus dans les γ et β -protéobactéries, y compris les pathogènes humains, animaux et végétaux. (137).

Les IMEXs ont un mécanisme capable d'exploiter la recombinaison Xer ce qui permet aux bactéries d'évoluer et de s'adapter par l'acquisition et la réorganisation de gènes pertinents. Ils ont contribué à l'évolution bactérienne en jouant un rôle important dans le transfert de gènes et des facteurs de virulence et surtout dans l'apparition de la multirésistance aux médicaments, chez plusieurs espèces bactériennes(138).

Il a été suggéré qu'un nouveau mécanisme reposant sur le système de recombinaison Xer/*dif* pourrait être responsable du déplacement de certains gènes de résistance. Le séquençage d'isolats d'*A. baumannii* en 2009 a révélé la présence d'un gène de carbapénémase *oxa-24* dans le plasmide pABVA0. Ce gène était flanqué par des sites présentant une forte homologie avec les sites de recombinaison Xer (139). La comparaison de cette séquence avec celles d'autres plasmides d'*A. baumannii* provenant d'isolats cliniques français et américains a montré un squelette plasmidique similaire, mais avec des gènes variables à la place d'*oxa-24*, entre les sites de recombinaison Xer flanquants, ce qui suggère que ces modules (un ou plusieurs gènes flanqués de sites de type *dif*) pourraient être échangés par des événements de recombinaison. Ceci était la première suggestion que ces sites pourraient fonctionner comme une forme de cassette génétique ou un élément mobile. Ultérieurement, d'autres sites de recombinaison Xer ont été trouvés dans des plasmides isolés d'*A. baumannii*, et qui portaient le même gène *oxa-24*, entouré de sites de recombinaison Xer inversés ce qui suggère fortement que le gène *oxa-24* et les sites de recombinaison Xer qui l'entourent ont été déplacés entre les plasmides, comme un nouvel élément mobile. Par la suite, une série de plasmides portant des gènes de résistance *oxa-24*, *oxa-40* ou *oxa-72* provenant de diverses espèces d'*Acinetobacter* et de différents pays ont montré la conservation de ce module (139–143).

La comparaison entre les sites de recombinaison Xer de divers plasmides d'*Acinetobacter* et le site chromosomique *dif* a révélé une forte homologie au niveau du site de liaison XerD, de l'espaceur de 6 pb et le site de liaison XerC, repérable mais légèrement variable. Cependant,

aucune conservation de séquences d'ADN flanquantes ou accessoires n'a été rapportée entre les sites, ce qui suggère que ceux-ci ressemblent davantage au site *dif* chromosomique qu'aux sites plasmidiques typiques d'*E. coli* comme *cer* ou *psi* dont les rôles consistent à résoudre les dimères. En raison de cette organisation simple et de leur similarité avec le site *dif* chromosomique, les sites de recombinaison Xer du plasmide d'*Acinetobacter* ont été appelés sites *pdif*, lorsqu'il y a plusieurs sites dans un même plasmide (139,142,144).

Outre les vibriophages et les sites *pdif* décrits ci-dessus, un autre IMEX pertinent a été découvert : l'EludIMEX-1 trouvé chez *Enterobacter ludwigii* (145). Au cours de la dernière décennie, des *Enterobacter* spp. multirésistants sont apparus à cause de l'acquisition d'éléments mobiles qui portent de multiples gènes de résistance aux antibiotiques, notamment des β -lactamases à spectre étendu (BLSE), comme le *bla*_{CTX-M-15}, et des β -lactamases hydrolysant les carbapénémases, y compris les types KPC, NDM et OXA-48 (146,147).

EludIMEX-1 est un IMEX de 29,1 kb trouvé chez *E. ludwigii* qui porte le gène *bla*_{NMC-A} codant pour une carbapénémase à sérine. Il a été caractérisé pour la première fois par Antonelli et al. (2015) lorsqu'ils ont séquencé le génome entier d'un isolat NMC-A-positif d'*E. ludwigii*. Les résultats ont indiqué la présence d'une nouvelle région de 29 kb avec un contenu GC plus faible par rapport au génome bactérien, indiquant une éventuelle acquisition par transfert de gènes(145,148). De plus amples analyses ont révélé que cette région est flanquée par des sites de recombinaison XerC/XerD putatifs avec une grande homologie au niveau du site de liaison XerC. Ils ont également déterminé que le site d'insertion d'EludIMEX-1 dans le génome était le même pour les deux espèces distinctes du complexe *E. cloacae*, ce qui suggère une acquisition possible via un événement de recombinaison dépendant de XerC/XerD au niveau d'un site spécifique similaire au *dif* (12,145).

Une meilleure compréhension des mécanismes de contrôle et de neutralisation des IMEXs devrait contribuer à mieux maîtriser le processus d'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques chez les microorganismes pathogènes.

3. Le système de recombinaison à une seule recombinase

La plupart des bactéries ayant un chromosome circulaire possèdent des orthologues des protéines XerC et XerD (23,38) mais toutes les bactéries n'utilisent pas un système équivalent avec les deux protéines Xer pour résoudre les dimères de chromosomes. En fait, un grand nombre d'espèces utilisent des systèmes à une seule recombinase, phylogénétiquement distants, tels que: le système XerS qui est présent chez les *Streptococci* et les *Lactococci* (38,149); XerH utilisée par un sous-groupe de ϵ -protéobactéries, comme *Helicobacter pylori* et *Campylobacter jejuni* (23) et enfin la protéine XerA qui a été découverte chez les archées comme *P. abyssus* et *S. solfataricus* (Figure 8) (24,150,151).

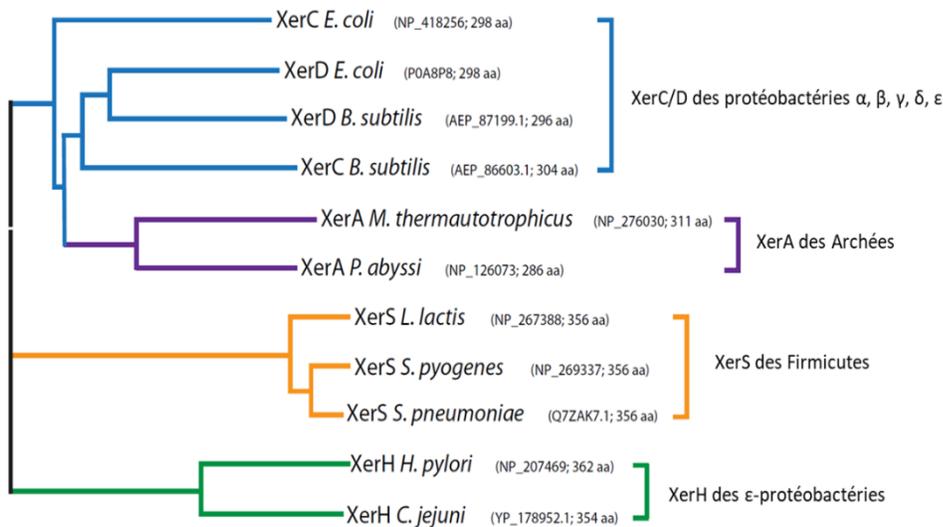


Figure 8. – Arbre phylogénétique des recombinases Xer montrant la distance phylogénétique entre les différents systèmes Xer (D'après (72))

Le numéro d'accession du National Center for Biotechnology Information (NCBI) et la taille de la protéine en acides aminés (aa) sont indiqués entre parenthèses. L'arbre phylogénétique a été préparé dans MEGA6 (152) en utilisant la méthode Neighbour-Joining (50). Les branches phylogénétiques sont marquées par des couleurs différentes. La longueur de chaque branche correspond à la distance phylogénétique.

3.1. Le système XerS/*difSL*

La présence de recombinases uniques a été mentionnée pour la première fois par Recchia et Sherratt (1999) suite à l'identification de deux génomes eubactériens ne contenant qu'un seul homologue de Xer. Cela a ensuite été confirmé lorsque Le Bourgeois et al. (2007) ont démontré que certaines espèces de *Lactococcus* et *Streptococcus* utilisent une machinerie de recombinaison Xer alternative(39,149).

Ce nouveau complexe Xer est basé sur une seule tyrosine recombinase appelée XerS (356 aa) qui agit sur un site de recombinaison atypique et conservé de 31 pb appelé *difSL* et qui a été identifié par génomique comparative sur la base de sa localisation et de sa seule apparition dans les génomes des streptocoques (149). Contrairement à *E. coli*, le gène *xerS* se trouve immédiatement adjacent au site de recombinaison *difSL* et agit comme un module unique. Le site *difSL* se distingue de la plupart des sites *dif* par sa large région centrale de 11 pb, comparativement aux 6 à 8 pbs normalement présents dans toutes les autres régions *dif* (Figure 7H) (153). Ainsi, le site *difSL* est constitué de deux sites répétés inversés imparfaits de tailles différentes séparés par la région centrale où se produit l'échange d'ADN. Dans une série d'expériences *in vivo*, il a été démontré que XerS est la seule recombinase streptococcique nécessaire à la résolution des dimères de chromosomes via la recombinaison du *difSL* (149).

Il a été montré que XerS présentait une interaction plus forte avec le demi-site gauche de *difSL* que le demi-site droit ainsi qu'une préférence pour initier la réaction de recombinaison sur le brin inférieur du site. Ces données démontrent qu'il existe un facteur de préférence pour l'endroit où les protéines se lient initialement au *difSL* et où elles initient la réaction de clivage du brin. Par conséquent, le monomère lié à gauche pourrait activer le monomère lié à droite en pliant l'ADN ou en changeant la conformation du second monomère, ce qui pourrait expliquer le clivage et l'échange préférentiels du brin inférieur (153). Ce facteur intrinsèque ne suffit pas pour contrôler la préférence de la directionnalité de la réaction de clivage du brin. Pour obtenir un contrôle adéquat, il est nécessaire de faire appel à une translocase FtsKSL, une protéine d'une longueur de 758 aa chez *Streptococcus mutans* ou de 816 aa chez *S. agalactiae* avec une faible similarité au niveau de la région N-terminale entre elle. Cette faible similarité n'affecte pas sa préférence de liaison au septum de division communément trouvé dans la plupart des protéines de la

superfamille FtsK-HerA (149). Lors des expériences de recombinaison *in vivo*, il a été démontré que la recombinaison de XerS dépend de la présence de la FtsK_C d'*E. coli*, ou de la FtsK_C streptococcique chez *S. pneumoniae*. Étant donné que le FtsK_C d'*E. coli* était suffisant pour soutenir la recombinaison XerS, il a été suggéré que la recombinaison XerS-FtsK_C ne présente pas de spécificité d'espèce. Il semble probable que XerS ne requiert pas une activation directe par des interactions avec FtsK_Y puisqu'elle ne contient pas des séquences correspondantes à la région XerD qui interagit directement avec FtsK_Y (41% de similarité avec FtsK d'*E. coli*). Au lieu de cela, FtsK_C semble être importante dans la régulation spatiale et temporelle de la recombinaison XerS, ainsi que pour assurer la résolution des dimères de chromosomes plutôt que leur formation (149). Enfin, il a été démontré que XerS de *Lactococcus lactis* se lie et clive la *dif*SL *in vitro* de manière asymétrique avec un biais vers l'un des bras de liaison de *dif*SL ; cependant, la réaction de recombinaison complète n'a pas pu être reconstituée *in vitro*, même en présence de FtsK_C (154).

3.2. Le système XerH/*dif*H

La protéine XerH, un autre type de recombinase unique, a été découverte en menant des recherches sur les espèces *Helicobacter* et *Campylobacter* (23). Elle agit sur un site de recombinaison appelé *dif*H de manière dépendante de FtsK (Figure 5). Il a été prouvé qu'elle était impliquée dans la ségrégation des chromosomes et probablement dans la résolution des dimères chez *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) et *Campylobacter jejuni* (*C.jejuni*) (155,156).

Les recombinases Xer sont classées en fonction de leur homologie de séquence, de leur regroupement phylogénétique distinct des autres types de recombinases à tyrosine, et de leur fonction dans la résolution des dimères de chromosomes (23). XerH est phylogénétiquement liée aux autres recombinases Xer (Figure 8). L'alignement de la protéine XerH de *C. jejuni* avec d'autres membres de la famille des recombinases Xer montre une similitude de séquence entre XerH et les autres Xer (Figure 9). Tout comme pour les autres tyrosine recombinases, le domaine catalytique C-terminal des Xer présente une conservation de séquence beaucoup plus élevée que le domaine de liaison à l'ADN N-terminal, plus variable, ce qui explique la différence au niveau des substrats d'ADN liés par les protéines. La recombinase XerH (354 aa à 362 aa) diffère des

recombinases traditionnelles XerC/D (298 aa) par sa taille et son homologie protéique (26% d'identité par rapport à XerC/D, Figure 9). Elle présente également plus de similitude avec XerS (356 aa) aussi bien par la taille de la protéine que par le haut degré d'homologie de leurs sites de recombinaison. Sur toutes les protéines Xer étudiées, XerH est la plus longue et elle contient une extension N-terminale qui est également présente chez XerH de *H. pylori*, la XerT, et sous une forme plus courte dans XerS, mais qui est absente dans XerC/D et XerA de archées. Ceci suggère que cette extension pourrait constituer une particularité des systèmes Xer bactériens à une seule recombinaison. Il est intéressant de noter que la plupart des espèces ϵ des protéobactéries possèdent un système XerH/*difH* alors que certaines autres ϵ -protéobactéries (*Sulfurimonas denitrificans* et *Sulfurovum*) possèdent un système analogue au système XerC/D classique(23,153,155,156).

```

XerH_(H_pylori)/1-362      1 MKHPLEELKDPTENLLWIGRFLRYKCTSLNSQVQDKNVFECLNELNQACS--SSQLLEKVCCKAR65
XerD_(E_coli)/1-298      1 -----MKQDLARIEQFDLALWLEK19
XerC_(E.coli)/1-298      1 -----MTDLHTDVERYLRYLSVER19
XerA_(P_abyssi)/1-286    1 -----MEEREVRDDTIEE15
XerS_(L.lactis)/1-356    1 -----MKRQLIQNI EK LKHIMP SYVLEYYSKLTIPYSLNTLYEYLKEYERFFSWLV53
XerH_(C_jejuni)/1-354    1 MKYPLDCEENFEKSFVFLWAKYVKFKLNSLSNKEKLNPKALAEVNFALTKGVKNIDELALTKAR66
XerT_(H_pylori)/1-357    1 --MSDCKMSRVSRLEFNNIKSF LHHK LKTMIRIQSVNDLQLVLKQDQVLECCSLIALKELNKRKY64

XerH_(H_pylori)/1-362    66 NAGLLGINTYALPLLK FHEYFSKARITERLAFNSLKNIDEVMLAEFLSVYTG--GLSLATKKNYR1130
XerD_(E_coli)/1-298      20 NLAENTLNAYRRDL SMMVWLHHRG L T-----LATAQSDDLQALLAERLEG--GYKATSSARLLS77
XerC_(E.coli)/1-298      20 QLSPI TL LN YQRQLEA I INFASENG L Q-----SWQQCDVTMVRNFAVRSRRKGLCAASLALRLS78
XerA_(P_abyssi)/1-286    16 FATYLELEGKSRNTVRMYTYI SKFFE-----EGHSPTARDALRF LAKLKRKGYSTRSLNLVIQ74
XerS_(L.lactis)/1-356    54 DSGVADVDTIDVSLVLENLTKRDL ES-----FILYLRERPLNTRSTRYGVSQTTINRSL111
XerH_(C_jejuni)/1-354    67 NAGLSGVNTYFNP LKKVFEYLFYKLY-----SLKQIDEELIVEVLASITG--ALSDASKKNYR1124
XerT_(H_pylori)/1-357    65 NQGI RHTIMMQGLFLFFEYFDRNIK LK-----SLHNLAEEQVIFDLFLGLAK--NRKPSMÄKYVM122

XerH_(H_pylori)/1-362    131 ALLGLFSYIDKQNDENEKSYIYNITLKNISG-----VNQSAGNKLP THLNNEELEKFL ESIDK1190
XerD_(E_coli)/1-298      78 AVRRLFQYLYREKFRDDPSAHLAS-----PKLPQRLPKDLS EAQVERLLQAPL--126
XerC_(E.coli)/1-298      79 ALRSFDFWLVSQNELKANPAKGVSA-----PKAPRHLPKNIDVDDMNRLLDID--126
XerA_(P_abyssi)/1-286    75 ALKAYKFEFEG----LDSEAEKLT-----PKMPKLPKSLTFEEVRRINIAA--117
XerS_(L.lactis)/1-356    112 ALSLYKYLTEEVENEDGEPPYFYNVMKKVQTKKSETLASRAENIKGLFLGDETGQGLDYIDNE177
XerH_(C_jejuni)/1-354    125 AVINFFDFLDKQN--EEDEKAHIFDINLKNWAG-----IAGSKGVLP EFMSEELKFLDAIENA183
XerT_(H_pylori)/1-357    123 YLRQFDYLDKKNRYSDFELKNLS-----FAKKETHLPKHLNKNDFAKFIQALLKY174

XerH_(H_pylori)/1-362    191 EMSAKVR-----ARNRLLIKIIVFTGMRSNALQLKIKDFTLENGCYTILIKKQDKYRA246
XerD_(E_coli)/1-298      127 -IDQPLE-----LRDKAMLEVLYATGLRVS ELVGLTMSDISLRQGVVRIIG--KGNKERL179
XerC_(E.coli)/1-298      127 -INDPLA-----VRDRAMLEVMYGALRLSELVGLDIKHLDESGEVVMG--KGSKERL179
XerA_(P_abyssi)/1-286    118 ----ET-----LRDLI LLLYGALRVSELCNLRVEDVNFYGVIVVRGG--KGGKDRV167
XerS_(L.lactis)/1-356    178 YEKTL SNRARSFFKNKERDLAIIALILASGIRLSEAVNVDRDLN LITMVVEVTR--KGGKRDV241
XerH_(C_jejuni)/1-354    184 DFKNNT-----IRNKLIKIIIFTGIRVSEAINIKMGDIS EENDLYIIRIRAKGNKYRV238
XerT_(H_pylori)/1-357    175 HPKTSFE-----KRNQCLLLIVLGLRKFALDLELKNIAL ENNHYRLLIKKNNKERYA230

XerH_(H_pylori)/1-362    247 MLKAFHIESLLKEWLIERE--LYPVKNDLLFC--NQKGSALTQAYLYKQVERIINFAGLRRE--K305
XerD_(E_coli)/1-298      180 PLGEEAVYWLETYLEHGRPWLLNGVSDVLF--SQAQQMTRQTFWHRIKHYAVLAGIDS E--K240
XerC_(E.coli)/1-298      180 PIGRNAVAWI EHWDLRD--LFGSEDDALFL--SKLGRISARNVQKRFÆEIQGLNN--H236
XerA_(P_abyssi)/1-286    168 PISELSLEIKRYLESRD--DSPYLFVEMK--RKRKDKLSPKTVWR LK KYGRKAGVEL--223
XerS_(L.lactis)/1-356    242 PYAPFAKTYFERYLEVRSRYKTTAKDTAFVTLYRDVPSRIDPSSVEKLVAKYSQAFKRVVT--304
XerH_(C_jejuni)/1-354    239 MIKKELEYDL LKNVSI N--YMSKDALLEV--NKKGTPLTQSYVSRIVEQLLFRAGIRKQ--K294
XerT_(H_pylori)/1-357    231 YIEKEFLQIPLNAWLSDTKRLKSFKGRFVFKK--AKNNTTQKTCSLKGFI AKIFKLSNIDVKS YG293

XerH_(H_pylori)/1-362    306 NGAHMLRHSFATLLYQKRHDLILVQEA LCHASLNTSRYYTHFDKQRL EEAASIWEEN-----362
XerD_(E_coli)/1-298      241 LSPHVLRFHAFATHLLNHGADLRVVQMLLGHSDLSTTQIYTHVATERLRQLHQHHPRA-----298
XerC_(E.coli)/1-298      237 VHPHKLRFHAFATHLES SGLRCVQEL LCHASLNTTQIYTHLDFQHLASVYDAAHPRAKRKG--298
XerA_(P_abyssi)/1-286    224 -TPHQLRHSFATHMLERGI DIRIQEL LCHASLNTTQIYTKVSTKHLKEAVKAKLVES IIGS286
XerS_(L.lactis)/1-356    305 --PHKRLHTLATRLYAQTNSQVLSVSNQLGHASTQVTDLYTHIINEEQNALDNL-----356
XerH_(C_jejuni)/1-354    295 NGAHMLRHSFATLLYKQKDLVLVQEA LCHASLNTSRYYTHFDNDKLLKAAQVAKELSDS----354
XerT_(H_pylori)/1-357    294 LGLHLRFHSFATFIYDETDQLVLSRALGHSSLLSTKIIHTTQEHNNKVALVLGGLLRNEKSE357

```

Figure 9. – Alignement des séquences de XerH de *Campylobacter jejuni* et d'autres recombinases Xer (D'après (72))

Les résidus catalytiques invariants sont encadrés en rouge. La couleur des résidus indique le niveau de conservation des résidus ; plus la couleur est foncée, plus le résidu est conservé. L'alignement a été préparé par ClustalW2 (157) et visualisé à l'aide du logiciel Jalview (158).

Le site *difH* présente des caractéristiques communes à tous les sites *dif* connus : il a une faible teneur en G+C, se situe dans une région intergénique dans la région du terminus établie selon le skew, il présente une palindromicité importante et il est situé dans une partie non codante du

génomique(23). Tout comme pour le système de recombinaison *XerS/difSL*, le gène *xerH* et le site *difH* sont proches l'un de l'autre (1981 pb), formant ensemble un module génétique distinct (149).

Le site *difH* est constitué de deux régions hautement conservées séparées par une région variable. Les sites de clivage de XerH peuvent être prédits à partir d'une comparaison entre *difH* et *dif* d'*E. coli* en supposant que le clivage aura lieu aux limites des régions palindromiques et que les sites de clivage flanquent une région centrale de 6 à 10 pb (Figure 71). Le consensus entre les deux sites montre que les nucléotides des bras de liaison palindromiques proches de la région centrale sont conservés. Cette observation est en accord avec la forte conservation de la séquence dans ces parties de tous les sites *dif* étudiés, et il a été proposé que ces régions puissent être cruciales pour la liaison à Xer et pour le maintien de l'activité de Xer (23,72).

En absence de XerH, aucune filamentation n'a été observée chez *H. pylori*, malgré une plus lente croissance par rapport au type sauvage. Ceci contraste avec ce qui a été observé chez *E. coli*. De même, la surexpression de la protéine XerH entraîne un effet similaire, ce qui signifie que la régulation au niveau de XerH est importante (155). De plus, une plus grande quantité d'ADN a été observée chez les mutants *xerH*, ce qui semble être un signe d'un défaut de ségrégation. Dans les cellules surexprimant XerH, la quantité d'ADN est également plus importante. Cela signifie que soit l'initiation de la réplication est stimulée par XerH, soit, plus probablement, qu'il y a une interférence avec la ségrégation correcte des chromosomes. Les mutants *xerH* présentent une plus grande sensibilité à la lumière UV ainsi qu'à la ciprofloxacine. Cet effet est semblable à celui observé en supprimant FtsK, ce qui mène à l'hypothèse que l'interaction entre FtsK et XerH est importante. Ces phénotypes sont associés au mécanisme de résolution des dimères de chromosomes, compte tenu du fait que les dommages causés par ces agents augmentent la quantité de dimères et de caténanes dans la cellule. Les conséquences de la mutation de la protéine XerH apparaissent non seulement au niveau de l'ADN mais également au niveau de la pathogénicité de la bactérie puisque des mutants *xerH* de *H. pylori* demeurent incapables de coloniser l'estomac de la souris (155). Par contre, une réaction de recombinaison complète a été observée lorsque le système *XerH/difH* de *C. jejuni* était transféré dans *E. coli*. Ce qui signifie donc que la recombinaison *XerH/difH* pourrait être indépendante de FtsK ou bien qu'il n'y a pas de spécificité d'espèces (155,156).

3.3. Le système XerA/*dif*

Les archées possèdent des chromosomes circulaires et ont un système de recombinaison homologue actif (159). Par conséquent, il est prévu qu'elles résolvent les dimères chromosomiques pour assurer une ségrégation chromosomique adéquate. La recherche de systèmes de recombinaison Xer chez les archées a révélé la présence d'une recombinase conservée XerA et un site putatif de résolution des dimères chromosomiques, *dif*, situé dans la région terminale de réplication (150,160). La recombinase XerA possède un domaine C-terminal conservé où résident la tyrosine active et les résidus catalytiques conservés (R-K-H-R-[H/ W]-Y). Les protéines XerA sont bien conservées entre les espèces des archées avec 85% de similarité de séquence. L'emplacement du gène *xerA* est très variable chez les archées ; certaines espèces présentent des séquences *xerA/dif* séparées alors que d'autres possèdent un module *xerA/dif* individuel(12).

Le site *dif* des archées ressemble davantage au site *dif* du système de recombinaison XerC/D qu'aux sites *dif* d'autres systèmes Xer à une seule recombinase. Contrairement à la plupart des bactéries, le site *dif* ne se trouve pas à 180° de l'*oriC* et inversement, il se situe entre 122° et 144° de l'*oriC*, même si le génome de *Methanosphaera stadtmanae* présente un site *dif* à 180° de l'*oriC*. Les séquences de type *dif* ont la structure traditionnelle : deux séquences répétées inversées de 11 pb séparées par une région centrale de 6 pb.

Des études sur la liaison du *dif* des archées ont révélé que XerA de *P. abyssi* se lie au site *dif*, formant séquentiellement deux complexes de poids moléculaire plus élevé et il a été démontré que XerA catalyse les réactions de clivage sans aucune préférence de brin détectable (150,160). Cependant, l'incubation de XerA avec un substrat d'ADN représentant le site de liaison d'une recombinase tyrosine non apparentée a donné lieu à une liaison similaire. À une température élevée (65 °C) qui est plutôt physiologique pour l'espèce thermophile *P. abyssi*, la formation du complexe spécifique XerA/*dif* a été multipliée par huit par rapport au complexe non spécifique (150). La protéine XerA a également été active dans un test de clivage et d'échange de brins *in vitro* avec des substrats d'ADN représentant des demi-sites *dif*, ce qui a permis de cartographier, avec précision, les sites de recombinaison (160). De plus, XerA a été capable de recombiner des plasmides *in vitro* (dans des réactions de résolution et de multimérisation) sans aucune protéine

supplémentaire un résultat qui n'a pu être observé à ce jour avec aucune autre recombinaise Xer (150).

Bien que la plupart des génomes des archées codent pour la recombinaise XerA qui résout les dimères de chromosomes, aucun homologue de FtsK n'a pu être identifié chez elles (161). De plus, le fait que les *P. abyssi* soient capables de recombiner des plasmides *in vitro* en absence de tout partenaire protéique, confirme que la recombinaison de XerA n'est pas régulée par FtsK (150). Cependant, des tests *in vitro* ont montré des niveaux de multimérisation de plasmides beaucoup plus élevés que la résolution en monomères, ce qui suggère qu'un mécanisme supplémentaire pourrait contribuer à assurer la résolution topologique des dimères de chromosomes. Ce mécanisme pourrait fonctionner de manière similaire à la régulation par FtsK. En fait, une ADN translocase apparentée, HerA, a été suggérée comme une protéine potentielle qui pourrait réguler la recombinaison XerA (162). En accord avec cette notion, des séquences d'ADN polarisées qui pourraient servir de guide à l'ADN hélicase ont été identifiées (150). En effet, des motifs de type KOPS ont été trouvés chez les archées. Ces motifs sont constitués de quatre nucléotides (GTTG OU GTTC) appelés ASPS (*Archaea Short Polarized Sequences*) qui sont orientés vers les sites *dif*, ce qui donne un schéma similaire à celui observé chez les bactéries. Cependant, le rôle de HerA dans le lien entre la recombinaison de XerA et la division cellulaire n'a pas encore été confirmé.

Les récentes progressions dans la résolution de la structure cristalline de plusieurs recombinaises à tyrosine des archées ont démontré que leur domaine catalytique présente des similitudes avec d'autres enzymes bactériennes connues. Cependant, les modalités par lesquelles les recombinaises des archées interagissent avec leur substrat d'ADN restent à explorer et pourraient être abordées en résolvant la structure complète des complexes protéine-ADN par co-cristallisation ou par microscopie cryo-électronique (24).

3.4. Le système XerH/*difH* de *Campylobacter jejuni*

Cette étude s'intéresse essentiellement au système XerH/*difH* de *C. jejuni*. Le site *difH* de *C. jejuni* a été prédit en 2009 par calcul à l'aide d'outils de recherche de similarité (Figure 10)(23) et il a été démontré qu'il est en grande partie similaire à celui de *H. pylori*, ce qui est cohérent

avec le fait que les deux protéines XerH sont étroitement liées (48,6 % d'identité de séquence, Figure9).



Figure 10. – Le *difH* prédit de *Campylobacter jejuni*

Les résidus de *difH* invariablement trouvés chez les espèces apparentées à *Campylobacter jejuni* sont marqués en bleu. Les positions de clivage XerH attendues sur *difH* sont marquées par des triangles rouges et ont été prédites sur la base des sites de clivage XerC/D connus sur *dif*, en supposant que le clivage se produira aux limites des régions palindromiques et que les sites de clivage flanquent une région centrale de 10 pb (il a été prouvé que l'espaceur de *S.suis* est de 11pb alors que les sites des autres bactéries sont de 6 à 8pb)

La liaison de XerH de *C.jejuni* à son site *difH* a été analysée *in vitro* (156). Deux sous-unités de XerH se lient de manière coopérative de chaque côté avec une affinité similaire de liaison au site gauche ou droit par rapport au site complet, probablement en raison de la similarité entre les séquences externes des deux bras. De plus, les résultats d'affinité de liaison trouvés chez *C. jejuni* contredisent ceux observés chez *H. pylori* par Bebel et al. (2016) et chez la plupart des recombinases à tyrosine impliquées dans la résolution des chromosomes puisqu'elles n'ont pas montré de préférence de liaison (37). D'autre part, contrairement à l'activité de liaison, des réactions de clivage asymétrique par XerH ont été trouvées avec une efficacité plus élevée pour les substrats de brin inférieur que de brin supérieur, ce qui est en accord avec les résultats de

Bebel et al. (37,72,156). Leroux et al. ont testé la recombinaison XerH/*difH* *in vivo* entre deux sites *difH* situés sur le même plasmide et ils ont montré que cette réaction est indépendante de la protéine FtsK, mais dans leurs essais, les produits de recombinaison n'étaient présents qu'en petites quantités après un grand nombre de générations d'*E. coli* et la recombinaison par XerH n'a pas pu être détectée dans des conditions *in vitro*(156).

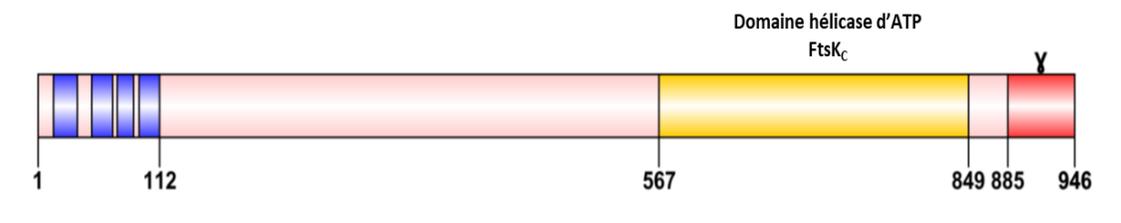


Figure 11. – Représentation des domaines de la protéine FtsK de *C.jejuni* (D'après (72))

Les hélices transmembranaires du domaine N-terminal transmembranaire sont indiquées en bleu. Le domaine hélicase d'ATP C-terminal (FtsK_C) est constitué de trois sous-domaines α (jaune), β (orange), et γ (rouge).

Il est intéressant de noter que, malgré les similitudes entre les sites de recombinaison *difH* de *C. jejuni* et *difSL* de *S.suis*, les recombinases ne réagissent pas de manière croisée (XerH ne se lie pas à *difSL* et XerS ne se lie pas aux sites *difH*) (Leroux et al., non publié). Ceci suggère que ces deux recombinases ne partagent pas le même mécanisme de liaison à l'ADN et pourraient ne pas être fonctionnellement homologues (156).

Campylobacter jejuni

1. Historique et Taxonomie

En 1886, un médecin allemand, Theodore Escherich a découvert des preuves microscopiques de bactéries en forme de spirale en examinant les selles d'enfants diarrhéiques. Mais les méthodes de culture traditionnelles ne lui ont pas permis d'isoler et cultiver ces organismes (163). Cependant, ce n'est qu'à partir de 1906 que *Campylobacter* a été identifié pour la première fois, par les deux chercheurs vétérinaires britanniques McFadyen et Stockman. Ces derniers ont décrit l'isolement de *Campylobacter* au cours d'une enquête sur les taux d'avortement anormalement élevés dans les troupeaux de moutons (164). En menant des recherches similaires sur les avortements bovins, Smith et Taylor ont trouvé les mêmes bactéries "vibrioniques", et ont été les premiers à les dénommées *Vibrio fetus* (165).

Plus d'une décennie plus tard, en 1931, une bactérie du même genre, trouvée dans les jéjunums de bovins atteints de diarrhée, a été découverte par Jones et al. La nouvelle espèce a été nommée *Vibrio jejuni* (166). En 1944, Doyle a décrit un micro-organisme similaire associé à la diarrhée porcine. Ce micro-organisme fut dénommé *Vibrio coli* (167).

La première description chez l'homme de *Vibrio jejuni* a eu lieu en 1946, lors de l'analyse des sangs et des selles de patients diarrhéiques (168). Alors que celle de *Vibrio fetus*, elle a été citée comme étant la cause d'un avortement septique chez une femme en 1947, et pendant les 3 décennies suivantes, les chercheurs ont cru que le micro-organisme responsable était un pathogène rare, opportuniste et invasif qui se manifestait principalement chez des hôtes affaiblis. (169).

En 1963, le genre *Campylobacter* appartenant à la classe Epsilonproteobacteria fût proposé par Sebald and Véron, distinguant les Campylobacters des vibrios en raison de leur faible pourcentage en Guanine + Cytosine (30-34% au lieu de plus de 43% chez les vibrios), de leur métabolisme non fermentatif et de leurs exigences en matière de croissance microaérophile (170).

En 1972, *Campylobacter jejuni* a été isolé pour la première fois par un microbiologiste en Belgique à partir d'échantillons de selles d'une patiente souffrante de bactériémie, en utilisant la même technique de filtration développée par des vétérinaires dans les années 1960 (171,172).

Ce n'est que plus tard, dans les années 1970, avec le développement de milieux de culture plus adaptés et la découverte de la température optimale et des conditions atmosphériques appropriées par Skirrow, que *Campylobacter* a finalement été reconnu comme une source importante de gastro-entérite bactérienne (173).

D'autres études menées dans les années 1970 et 1980 ont permis d'approfondir les connaissances sur *C. jejuni* et d'autres espèces de *Campylobacter*, notamment leur milieu naturel, leur implication dans les maladies et leurs mécanismes pathogènes (174).

La première taxonomie complète du genre *Campylobacter* a été publiée en 1973 en le divisant en quatre espèces : *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter coli* et *Campylobacter sputorum* (175). Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis, par la suite, d'augmenter considérablement le nombre d'espèces (171,173).

Grâce à cet essor, la systématique des *Campylobacter* a pu être précisée. La classification actuellement utilisée est basée sur la comparaison des ARNr 16S et la composition en acide gras membranaire (176). Avec les genres *Arcobacter* et *Sulfurospirillum*, ils forment ainsi la famille des *Campylobacteriaceae*, qui appartient à la branche epsilon (ϵ) des protéobactéries. Actuellement, au moins 39 espèces et 16 sous-espèces de *Campylobacter* sont répertoriées (177,178).

C. jejuni appartient au groupe delta-epsilon des protéobactéries. Ce groupe diverge de manière significative du sous-groupe gamma qui contient de nombreux entéropathogènes humains tels que les salmonelles, *Escherichia coli* et *Shigella* (179).

2. Caractéristiques microbiologiques et biochimiques

Les membres du genre *Campylobacter* sont des bâtonnets Gram-négatifs, non sporulés. Il s'agit de micro-organismes relativement petits (0,2-0,8 μm de large x 0,5-5 μm de long), qui, dans

des conditions de croissance optimales, existent sous la forme de bâtonnets en spirale ou en forme de "S" (Figure 12) (170,180). *Campylobacter* tire son nom du grec kampylos, qui signifie courbé ou plié, et bacterium qui signifie bâtonnet. Le nom d'espèce *jejuni* provient des sites où l'organisme fait ses dégâts, le jéjunum et l'iléon (181). Les *C. jejuni* sont également considérées comme des bactéries pléomorphes ; lorsque les cellules s'approchent de la phase stationnaire ou dans des conditions de stress, elles prennent une forme coccoïde (182).

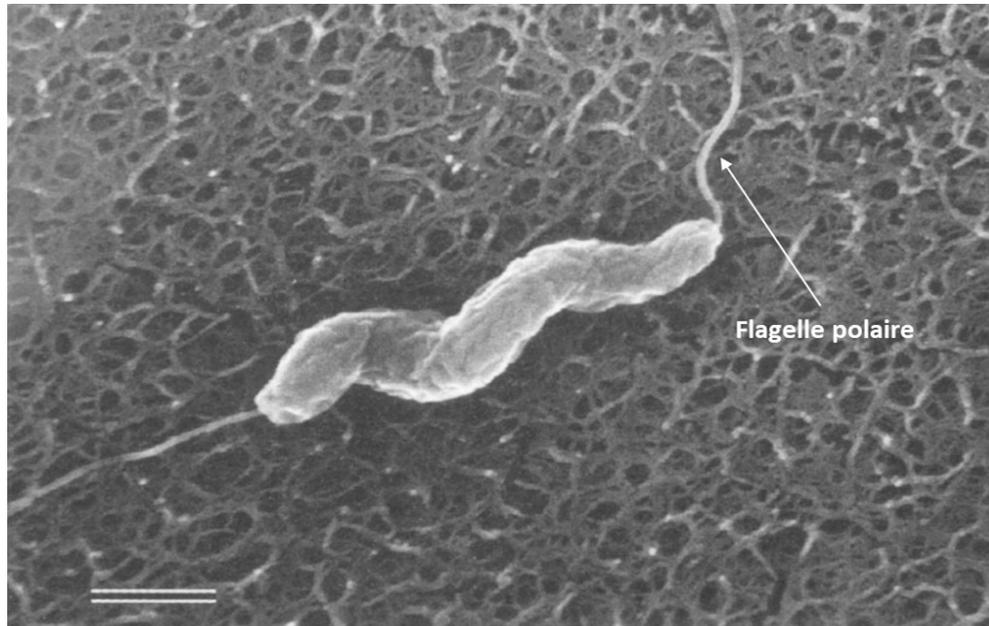


Figure 12. – Micrographie électronique à balayage de *Campylobacter jejuni* (D'après (183))

La forme spirale caractéristique de *C. jejuni* avec les flagelles aux deux extrémités de son corps. Barre = 500 nm.

C. jejuni sont des micro-organismes qui nécessitent des conditions de croissance complexes, ce qui les rend assez fastidieux de culture (184). Ils sont principalement microaérophiles et ont donc besoin d'une quantité limitée d'oxygène, capnophiles et se développent donc mieux dans des atmosphères contenant entre 5-10% O₂, et 3-15% CO₂ (182). Ils sont positifs à l'oxydase et à la catalase et négatifs à l'indole et l'uréase. Ils se différencient des autres espèces du genre *Campylobacter* par leur capacité à hydrolyser l'hippurate (174,177,185). Ces tests biochimiques

combinés à des tests de sensibilité à l'acide nalidixique et à la céphalothine ont été utilisés dans le passé comme moyen d'identification des espèces de *C. jejuni*. Cependant, cette méthode d'identification n'est plus fiable en raison de la fréquence élevée de la résistance aux fluoroquinolones et à d'autres antibiotiques chez *C. jejuni*. La résistance à certains antibiotiques, tels que la tétracycline, l'ampicilline, les fluoroquinolones, est également une des caractéristiques de *C. jejuni* (186–188).

C. jejuni se subdivise en deux sous-espèces : *C. jejuni* subsp. *jejuni* et *C. jejuni* subsp. *doylei*. *C. jejuni* subsp. *doylei* diffère de *C. jejuni* subsp. *jejuni* par l'absence de réduction des nitrates, la sensibilité à la céphalothine et une faible réaction à la catalase(174).

La survie de *C. jejuni* en dehors de l'intestin de l'hôte normal est faible, et la réplication ne se produit pas facilement. Cette espèce est thermotolérante et elle se développe entre 37 et 42°C, avec un optimum de croissance à 41.5°C, la température corporelle approximative du poulet (170,189). Ainsi, les caractéristiques thermophiles (qui aiment la chaleur) de *C.jejuni* sont une forme d'adaptation à la croissance dans son habitat normal, les intestins des oiseaux et des mammifères à sang chaud (189).

La bactérie *C. jejuni* est sensible à une grande variété de traitements physico-chimiques ainsi qu'à des méthodes de traitement des aliments telles que le séchage, la congélation et le salage. Elle est également sensible à la pression osmotique, aux concentrations d'oxygène supérieures à 5 %, et il n'a pas été signalé qu'elle se développe à des températures inférieures à 30°C(190). De plus, elle résiste très mal aux variations de pH. Le pH optimal pour sa croissance est compris entre 6,5 et 7,5. Elle est sensible à des pH inférieurs à 4,9 et supérieurs à 9, mais elle peut croître à des pH s'échelonnant de 5,5 à 8 (170,191).

Ces bactéries sont mobiles et se déplacent selon un mouvement caractéristique souvent appelé mouvement en « tire-bouchon », à l'aide de leurs flagelles unipolaires ou bipolaires non gainés qui peuvent être 2-3x plus grand que la longueur de la cellule (Figure 12) (180,192).

3. Épidémiologie et prévalence

Campylobacter et plus particulièrement *C. jejuni* est l'une des principales causes d'une maladie bactérienne d'origine alimentaire chez l'homme dans le monde entier, la campylobactériose, et représente un problème majeur de santé publique. La campylobactériose est la principale origine bactérienne des infections gastro-intestinales chez l'homme dans les pays développés et en voie de développement (193,194). Le nombre de cas confirmés n'a pas cessé d'augmenter dans les pays de l'Union européenne. En 2019, la campylobactériose a été la zoonose la plus fréquemment signalée, comme c'est le cas depuis 2005, représentant 50 % de tous les cas signalés. Le nombre de cas confirmés dans l'Union européenne était de 220 682 cas, correspondant à un taux de 59,7 pour 100 000 habitants (195). Cette augmentation explique bien la prise en compte plus systématique de *Campylobacter* dans les systèmes de surveillance et les détections mieux maîtrisées au laboratoire. Aux États-Unis, selon les centres de contrôle des maladies, il y a environ 1,3 million de cas d'infection à *Campylobacter* chaque année aux États-Unis seulement. Cela entraîne un coût économique de 1,3 à 6,8 milliards de dollars par an. En mars 2013, ces centres ont signalé une augmentation de 14 % des cas de *C. jejuni* aux États-Unis par rapport au nombre signalé en 2012 (196–198). Au Canada, une moyenne de 9 828 cas de campylobactériose a été signalée chaque année pour la période de 2011 à 2015 (199). Dans le sud-ouest de l'Alberta, le taux de campylobactériose, causée principalement par *C. jejuni* (59,7 cas pour 100 000 habitants), est considérablement plus élevé que la moyenne provinciale (28,5 cas pour 100 000 habitants) et nationale (30,0 cas pour 100 000 habitants)(200–202). Au Québec, la campylobactériose est la maladie entérique la plus fréquemment déclarée dans le système des maladies à déclaration obligatoire (MADO), avec 2000 à 3000 cas chaque année. L'incidence annuelle cumulée de la campylobactériose humaine est en moyenne de 38,06 pour 100 000 habitants en 2017, un taux considéré comme élevé par rapport à celui déclaré pendant la période de 2012 à 2016 (33,56 cas pour 100 000 habitants) ainsi que par rapport au taux d'incidence annuel signalé entre 1996 et 2006 (35,2 cas pour 100 000 habitants) (203–205).

Il existe une grande disparité entre l'incidence de la campylobactériose dans les pays en voie de développement et celle des pays développés. Dans les pays développés, 90 % des cas surviennent pendant les mois d'été. Une des hypothèses proposées qui pourrait expliquer ce phénomène, la

consommation de la viande insuffisamment cuite dans les établissements en plein air. Mais la saisonnalité reste toujours un mystère surtout avec une augmentation d'incidence en population humaine avant celle observée dans les élevages avicoles. Cette maladie touche le plus souvent les enfants de moins de 4 ans et les jeunes adultes âgés de 15 à 44 ans. Alors que dans les pays en voie de développement, le taux de contamination par *Campylobacter* varie de 5 à 20 %. La campylobactériose peut toucher tous les groupes d'âge, bien qu'elle affecte principalement les patients en bas âge. Dans ces pays, *Campylobacter* est de plus en plus impliqué dans les retards de croissance des enfants de moins de 2 ans (193,196,206,207).

Certains aspects de l'épidémiologie des infections à *Campylobacter* chez les humains sont bien établis : les bactéries colonisent naturellement le tube digestif de nombreux animaux tels que les oiseaux sauvages ou domestiques (volailles) qui ont été identifiés à plusieurs reprises comme la source principale d'infections humaines, quelle que soit la région géographique (208–210), ainsi que les mammifères tels que les chats, les chiens ou encore les bovins et les ovins (211). La viande de volaille est considérée parmi les plus importantes sources de contaminations par *Campylobacter* soit directement ou indirectement représentant ainsi 60% des cas signalés. En revanche, les voies et les sources environnementales de contamination de l'homme par *Campylobacter* (par exemple l'eau non traitée, le lait non pasteurisé et le sol) sont ainsi très diverses et moins bien comprises, et ces sources ont été estimées comme responsables de 4 à 20 % des cas cliniques (208–210,212–214). Les sources de contamination

4. Pathogénicité et maladies

Campylobacter a des mécanismes de survie complexes et pas encore complètement connus pour surpasser les barrières de l'hôte et provoquer des maladies chez l'homme. Il faut cependant souligner que les études sur la pathogenèse de *Campylobacter* sont généralement réalisées sur *C. jejuni* (215).

La colonisation de l'hôte, l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales eucaryotes par *C. jejuni* nécessitent une chimiotaxie et une motilité flagellaire. L'acquisition du fer, la résistance aux

acides gastriques et aux sels biliaires et la défense contre le stress oxydatif sont importantes pour la croissance et la survie de la bactérie. Les toxines bactériennes Cdt pour «Cytolethal distending toxin» provoquent les réponses inflammatoires et les dommages tissulaires (177,216).

De nombreux facteurs putatifs de survie et de virulence sont considérés comme importants pour la pathogenèse et l'induction de la gastro-entérite par *C. jejuni*. Plusieurs gènes ont été identifiés comme des facteurs importants pour l'expression de la pathogénicité. Les gènes *flaA* (gène de la flagelline A), *dnaJ*, *racR* et *cadF* (gène de l'adhésine) sont les gènes impliqués dans la colonisation et l'adhérence. Les gènes *iamA* (gène A associé à l'invasion), *virB11* (plasmide de virulence) et *ciaB* sont les gènes associés à l'invasion. *cgtB* et *wlaN* (β -1,3-galactosyltransférases) sont identifiés comme les gènes impliqués dans la production de lipopolysaccharides et *cdtC*, *cdtB* et *cdtA*, (*cytolethal distending toxins C, B, and A*) sont des gènes de virulence importants pour l'expression et la production des cytotoxines (41,217–220).

La dose infectieuse par *Campylobacter* est faible et il a été rapporté qu'aussi peu que 800 cellules peuvent causer la maladie (221). Les infections à *Campylobacter* sont plus fréquentes chez les immunodéprimés, les personnes âgées et les enfants (184,196,217). *C. jejuni* peut provoquer un grand nombre de maladies allant d'une colonisation asymptomatique ou une diarrhée légère, non inflammatoire et autolimitée à une diarrhée sévère, inflammatoire et sanglante associée à de fortes douleurs abdominales, qui peut durer quelques semaines. Elle a également été associée à des cas de bactériémie, d'endocardite, de méningite, d'infection des voies urinaires et d'autres maladies extra-intestinales, notamment le syndrome de Guillain-Barré et le syndrome de Miller-Fisher. Les complications post-infectieuses sont rares: environ 1 % des patients développent une arthrite réactive et environ 0,1 % présentent le syndrome de Guillain-Barré (222–224).

5. Caractéristiques génétiques

La souche NCTC 11168 de *C. jejuni* a été isolée d'un patient atteint de campylobactériose en 1977. La séquence du génome de *C. jejuni* NCTC11168 a été publiée pour la première fois en 2000. Ce génome a été réannoté en 2007 pour inclure des références et des méthodologies plus

récentes (225). Au cours de la dernière décennie, les génomes complets d'autres souches de référence (NCTC 11828, 81-176, RM1221) ont été séquencés. Une grande partie de la séquence complète a été conservée dans ces souches, mais leurs génomes sont différents dans plusieurs points (226–228). La détermination de la séquence complète du génome de plusieurs souches de *C. jejuni* a annoncé le début d'une nouvelle ère de recherche sur cette bactérie (192,225,229).

C. jejuni possède un chromosome circulaire de 1 641 481 pb (30,6 % G+C), dont 94,3 % sont désignés pour coder des protéines (Figure 13). Il est présent en une seule copie dans la cellule. Le génome de cette bactérie est exceptionnel puisqu'il ne contient pratiquement pas de séquences d'insertion ou de séquences associées à des phages et très peu de séquences répétées(192).

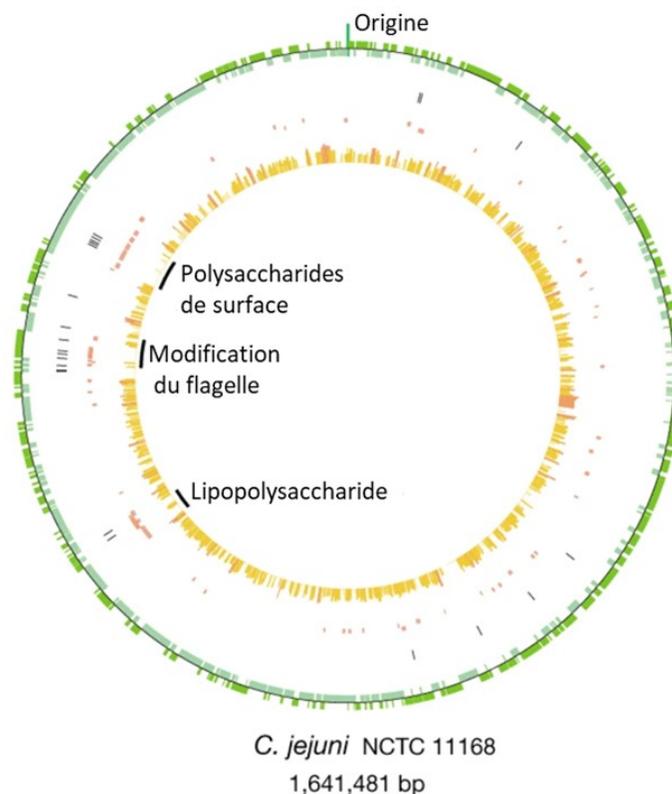


Figure 13. – Représentation circulaire du génome de *C. jejuni* (D'après (192))

De l'extérieur vers l'intérieur, le premier cercle montre les séquences codantes transcrites dans le sens des aiguilles d'une montre en vert foncé ; le second montre les séquences codantes dans le sens inverse des

aiguilles d'une montre en vert pâle. L'origine putative de la réplication est marquée. Le troisième montre les positions des séquences hypervariables en noir, et les quatrième et cinquième montrent les gènes impliqués dans la production des structures de surface : dans le sens des aiguilles d'une montre en rouge foncé et dans le sens inverse en rouge pâle. La partie intérieure de l'histogramme montre la similarité de chaque gène avec son orthologue *H. pylori*, lorsqu'il est présent ; la hauteur de la barre et l'intensité de la couleur sont proportionnelles au degré de similarité. Les groupes de gènes responsables de la biosynthèse du LOS (lipo-oligosaccharides), de la biosynthèse de l'EP (polysaccharide extracellulaire) et de la modification du flagelle sont marqués.

Chaque souche possède des particularités qui la différencie. Par exemple, le génome de *C. jejuni* NCTC 11168 est dépourvu d'insertions, de plasmides ou de transposons, ce qui constitue un caractère distinctif de cette souche (192). Le génome de *C. jejuni* RM1221 est composé de 94% de séquence codante et contient quatre éléments génétiques intégrés dont trois d'origine phagique et un correspondant à un îlot génétique. En revanche, une caractéristique unique du génome de *C. jejuni* NCTC11828 est la duplication d'une région de 6,5 kb, ce qui n'est pas présent ni dans les séquences génomiques des souches de *C. jejuni* NCTC11168 ni dans celles de RM1221 (192,228,230). *C. jejuni* 81-176 porte deux gros plasmides nommés pVir et pTet et ne présente pas d'insertion d'éléments génétiques d'origine phagique (231,232).

La plupart des souches de *C. jejuni* sont naturellement compétentes et capables d'acquérir des fragments d'ADN exogènes présents notamment dans l'environnement et de les incorporer à son génome, et le phénomène de recombinaison est très fréquent et constitue le principal facteur de diversité(233–235).

Problématique et Objectifs

Les protéines Xer sont capables d'interagir avec des sites *dif* génomiques pour résoudre des dimères de chromosomes, avec des sites pour résoudre des dimères de plasmides, et avec divers sites sur des éléments mobiles pour les insérer et les exciser vers et depuis le génome bactérien. Cela rend la famille des recombinases Xer exceptionnellement diverse en termes de fonction et de spécificité parmi les recombinases spécifiques de site. Une spécificité qui rend cette famille intéressante et incite à explorer ses composants et à comprendre son mécanisme de fonctionnement.

Malgré plusieurs études sur différents systèmes de recombinaison à une seule recombinase Xer, le mécanisme et la régulation de ces recombinases restent toujours peu clairs. Pour XerH/*difH* en particulier, l'étude de Leroux et ses collègues a élucidé le mécanisme de recombinaison dans *C.jejuni* (156). Cependant, plusieurs questions relatives à la recombinaison de XerH restent sans réponse. Les exigences exactes d'un site *difH* fonctionnel en termes de longueur et de séquence n'ont pas été testées ; plus précisément, les études antérieures sur *difH* de *C.jejuni* n'ont jamais révélé la taille exacte de son espaceur ou le site de clivage précis de XerH sur *difH*. En plus, les séquences indispensables pour que l'interaction XerH/*difH* soit achevée n'ont jamais été identifiées.

Dans cette caractérisation moléculaire de XerH, je cherche à comprendre le mécanisme spécifique de la recombinaison XerH/*difH*, en particulier comment ce système peut être régulé en termes de liaison et de clivage, et ce qui est nécessaire pour que la réaction de recombinaison soit fiable. Des mutants de site *difH* ont été utilisés afin de mettre en évidence l'importance des nucléotides de sites de liaison, site de clivage ainsi que la région centrale du site *difH* dans la réaction de liaison et de clivage. Le choix des nucléotides mutés a été basé sur deux paramètres: leur degré de conservation chez les bactéries et leurs influences sur les réactions de recombinaison d'autres systèmes Xer. Je voulais découvrir quelles sont les exigences exactes pour un site de recombinaison *difH* fonctionnel, comment XerH interagit avec *difH*, quelle est la nature

de la liaison XerH/*difH* et quels sont les autres facteurs qui pourraient être nécessaires pour ce processus.

Nos objectifs spécifiques sont : 1) identifier avec précision les sites de liaison et de clivage de XerH sur le site *difH in vitro* par des expériences EMSA en utilisant des protéines purifiées et des substrats d'ADN marqués par fluorescence 2) identifier les déterminants importants de la séquence *difH* nécessaires pour la liaison et le clivage de XerH en utilisant des sites *difH* créés par mutagenèse dirigée, des fragments de PCR marqués et des substrats suicide "entaillés".

Matériel et méthodes

Souches bactériennes et plasmides

L'ADN génomique de la souche *C. jejuni* RM1221 a été fourni par notre collection universitaire. Le gène XerH a été amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique de *C.jejuni*, cloné dans le plasmide pQE30 et a été introduit par transformation dans des cellules *E.coli* T7 express.

Le gène *difH* a été amplifié par PCR et cloné dans le site *SmaI* du vecteur pUC19. Ces techniques ont été décrites par Leroux et al.(156). Les souches *E. coli* turbo et DH5 α (NEB) ont été utilisées pour le clonage et la purification des plasmides contenant le site *difH* et les variants du *difH*. Toutes les souches bactériennes et les plasmides utilisés dans cette étude sont énumérés dans le tableau 1.

Tableau 1. – Souches et plasmides utilisés

Souches	Caractéristiques et/ou génotype	Source
<i>E. coli</i> T7 <i>lysY/lq</i>	Souche de surexpression de protéine MiniF <i>lysY lacI_q(Cam_R) / fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tets)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tets) endA1 Δ(mcrC-mrr) 114::IS10</i>	NEB
<i>E. coli</i> DH5 α	Souche de clonage <i>supE44 ΔlacU169 (ϕ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	NEB

<i>Turbo Competent E. coli</i>	F' <i>proA⁺B⁺ lacI^q ΔlacZM15 / fhuA2 Δ(lac-proAB) glnV galK16 galE15 R(zgb-210::Tn10)Tet^S endA1 thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5</i>	NEB
Plasmides		
pUC19	Vecteur de clonage	NEB
pQE30	Vecteur de clonage	NEB

Conditions de croissance bactérienne et manipulation d'ADN

Les souches d'*E. coli* ont été cultivées dans du bouillon Luria-Bertani (LB) et étalées sur de la gélose LB ou dans un milieu Super Optimal Broth (SOB). Au besoin, les antibiotiques suivants ont été ajoutés aux milieux de croissance : ampicilline (100 µg/ml), kanamycine (50 µg/ml) et tétracycline (10 µg/ml). La croissance des bactéries a été suivie en mesurant l'absorbance de la suspension à la longueur d'onde de 600 nm (OD600). Pour la production de protéines, les cellules ont été cultivées dans un milieu auto-inductible(236).

La souche *C jejuni* a été ensemencée sur de la gélose au sang et incubée dans des conditions capnophiles (8-10% CO₂, 5-10% oxygène) à 37°C dans une jarre anaérobique. L'ADN génomique de *C. jejuni* a été extrait en utilisant le kit DNeasy Tissue (Qiagen). Les plasmides ont été extraits à l'aide du kit QIAquick miniprep (Qiagen).

Les enzymes de restriction, les ADN polymérases et l'ADN ligase T4 ont été commandées auprès de New England Biolabs (NEB) et utilisées conformément aux instructions du fabricant.

Les oligonucléotides

Tous les oligonucléotides utilisés dans cette étude ont été achetés auprès d'Alpha DNA et ont été remis en suspension dans de l'eau distillée ou du tampon TE jusqu'à une concentration finale de 1mM ou 100 µM. Les oligonucléotides utilisés comme amorces de PCR sont répertoriés dans le tableau 2. La température de fusion des amorces a été estimée à l'aide de l'outil Tm Calculator (<https://tmcalculator.neb.com>).

Tableau 2. – Amorces pour les réactions PCR

Amorce ou oligonucléotides	Séquence	Source
CjXerH-F	CGG GATCCATGAAATACCCTTTAGATTGTGAAG	(156)
CjXerH-R	CGCTGC AGTCAAGAGTCACTTAATTCCTTG	(156)
cjdifH-F	AAGGTA AAAATCATAAAAAGTATGTAAAAATAGTAGC	(156)
cjdifH-R	ATATTTTTATTAATAAATCTTATATCAATCATAAAAAGA	(156)
M13-F	GTTTTCCCAGTCACGAC	Alpha DNA
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC	Alpha DNA
Ftsk-F	GAGGAGAAATTA ACTATGGCTTTAATG	Cette étude
Ftsk-R	TTACAAGATTTCCCTTTGTCCTT	Cette étude
Ftsk-BamHI-F	CTTGTAAGGATCCATGGCTTTAATGGCAAATC	Cette étude
Ftsk-PstI-R	GGATCCCTGCAGTTACAAGATTTCCCTTTGTC	Cette étude
Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée		
<i>difH</i> -M1-F	ATTTTTATATGAAA ACTGTAATTTTCATTGATTTTA	Cette étude
<i>difH</i> -M1-R	AAAAAATTATGAAAATTACAGTTTTCAA AACTAAAA	Cette étude
<i>difH</i> -M2-F	ATTTTGTATAGAAA ACTGTAATTTTCTAACTTTTTA	Cette étude
<i>difH</i> -M2-R	AAAAAAGTTAGAAAATTACAGTTTTCTATACAAAA	Cette étude

<i>difH</i> -M3-F	ATTTTGTATTCAAAAGTAAATTTTGAAACTTTTTTA		Cette étude
<i>difH</i> -M3-R	AAAAAAGTTTCAAAATTACAGTTTTGAATACAAAA		Cette étude
<i>difH</i> -M4-F	ATTTTGTATTGTAAACTGTAATTTACAACTTTTTTA		Cette étude
<i>difH</i> -M4-R	AAAAAAGTTTGTAAATTACAGTTTACAATACAAAA		Cette étude
<i>difH</i> -M5-F	ATTTTGTATTGATAACTGTAATTATCAAACCTTTTTTA		Cette étude
<i>difH</i> -M5-R	AAAAAAGTTTGTAAATTACAGTTATCAATACAAAA		Cette étude
<i>difH</i> -M6-F	ATTTTGTATTGAATACTGTAATATTCAAACCTTTTTTA		Cette étude
<i>difH</i> -M6-R	AAAAAAGTTTGAATATTACAGTATTCAATACAAAA		Cette étude
<i>difH</i> -M7-F	ATTTTGTATTGAAATCTGTAAATTTCAAACCTTTTTTA		Cette étude
<i>difH</i> -M7-R	AAAAAAGTTTGAATTTACAGATTTCAATACAAAA		Cette étude
<i>difH</i> -M8-F	ATTTTGTATTGAAAAGTATTTTTCAAACCTTTTTTA		Cette étude
<i>difH</i> -M8-R	AAAAAAGTTTGAATAATACACTTTTCAATACAAAA		Cette étude
<i>difH</i> -M9F	ATTTTGTATTGAAAACCTGCATTTTCAAACCTTTTTTA		Cette étude
<i>difH</i> -M9-R	AAAAAAGTTTGAATAATGCAGGTTTTCAATACAAAA		Cette étude
<i>difH</i> -M10-F	ATTTTGTATTGAAAAGTGCAGTTTTCAAACCTTTTTTA		Cette étude
<i>difH</i> -M10-R	AAAAAAGTTTGAATAACTGCAGTTTTCAATACAAAA		Cette étude
<i>difH</i> -M11-F	ATTTTGTATTGAAAAGTGAATTTTCAAACCTTTTTTA		Cette étude
<i>difH</i> -M11-R	AAAAAAGTTTGAATAATTACAGTTTTTCAATACAAAA		Cette étude
Oligonucléotides (utilisés dans les expériences de substrat de suicide)			
<i>difH</i> -WT-BN	<i>difH</i> -WT-TS	AATTTTGTATTGAAAAGTAAATTTTCAAACCTTTTT	(156)
	<i>difH</i> -WT-BSR	AAAAAAGTTTGAATAATTA	(156)
	<i>difH</i> -WT-BSL	CAGTTTTCAATACAAAAT	(156)
<i>difH</i> -WT-TN	<i>difH</i> -WT-BS	AAAAAAGTTTGAATAATTA CAGTTTTCAATACAAAAT	(156)

	difH-WT- TSR	TAATTTTCAAACCTTTTT	(156)
	difH-WT- TSL	ATTTTGTATTGAAAACCTG	(156)
<i>difH-M3-RHS</i>	difH-M3-R- TS	TAATTTTGAAAACCTTTTT	Cette étude
	difH-M3- LR-BS	AAAAAGTTTCAAATTACAGTTTTGAATACA	Cette étude
<i>difH-M3-LHS</i>	difH-M3-L- TS	ATTTTGTATTCAAACCTG	Cette étude
	difH-M3- LR-BS	AAAAAGTTTCAAATTACAGTTTTGAATACA	Cette étude
<i>difH-M10-RHS</i>	difH-M10- R-TS	CAGTTTTCAAACCTTTTT	Cette étude
	difH-M10- LR-BS	AAAAAGTTTGAAAACCTGCAGTTTTCAATACA	Cette étude
<i>difH-M11-LHS</i>	difH-M11- L-TS	ATTTTGTATTGAAAACCTG	Cette étude
	difH-M11- LR-BS	AAAAAGTTTGAAAATTACAGTTTTTCAATA	Cette étude

Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les amplifications par PCR ont été effectuées en utilisant les amorces énumérées dans le tableau 2, avec une concentration de stock d'amorces de 10 μ M, remises en suspension dans de l'eau distillée et stockées à -20 °C lorsqu'elles ne sont pas utilisées. Les réactions d'amplification ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur PCR à gradient Labnet MultiGene™ (Mandel Scientific) avec l'ADN polymérase High Fidelity Phusion (NEB) ou l'ADN polymérase Q5 (NEB) conformément aux instructions du fabricant. Tous les substrats d'ADN ont été récupérés et

purifiés par des procédures conventionnelles utilisant le kit de purification GeneJet plasmid miniprep ou GeneJet PCR de ThermoFisher. La concentration d'ADN a été déterminée par spectroscopie ultraviolette (UV) à 260 nm à l'aide d'un appareil NanoDrop (Thermo Scientific) et par fluorimétrie QuBit (Invitrogen).

Tous les produits PCR clonés ont été vérifiés par séquençage à la plateforme génomique de l'IRIC de l'Université de Montréal.

Mutagenèse dirigée

Les mutants de *difH* ont été créés par mutagenèse dirigée en utilisant le kit de mutagenèse dirigée Q5 (NEB) avec les amorces listées dans le tableau 2 et utilisées selon les conditions du fournisseur. Les mutations ont été introduites par PCR où les amorces contenaient le changement souhaité flanqué de 10 à 25 nucléotides de chaque côté du mésappariement. Les amorces ont été conçues de telle sorte que chaque demi-site flanquant le mésappariement ait une température de fusion de 58 °C, la température de fusion de l'amorce complète étant proche de 68°C. Les amorces utilisées ont été phosphorylées en 5' par le fabricant. Une seule amorce contenant la mutation souhaitée a été utilisée dans chaque PCR (avec deux amorces utilisées en parallèle pour chaque cible de mutagenèse comme indiqué dans le tableau 2), ce qui a entraîné l'amplification d'un plasmide simple brin, ligaturé par la Taq DNA ligase dans la même réaction. Les produits de la réaction ont été purifiés à l'aide du kit de purification QIAquick PCR (QIAGEN) selon les instructions du fabricant et élués dans de l'eau distillée. Afin de dégrader tout l'ADN plasmidique restant, l'échantillon a été incubé avec 2 µl de tampon FastDigest 10x et 2 µl d'enzyme de restriction FastDigest DpnI (les deux provenant de Thermo Scientific). 5µl de l'échantillon ont ensuite été transformés dans des cellules compétentes *E. coli*, où le plasmide simple brin a été répliqué par la machinerie de réplication de l'hôte, et étalé sur LB contenant les antibiotiques appropriés. Le résultat de la mutagenèse a été validé par le séquençage des plasmides double brin obtenus.

Surexpression et purification des protéines

Les protéines XerH ont été exprimées en tant que protéines de fusion 6X-His à l'extrémité N-terminale en utilisant le plasmide pQEXerH introduit dans des cellules T7 express. Après une croissance pendant une nuit, 1 ml d'une culture de 5 ml de bouillon LB de ces cellules a été utilisé pour inoculer 100 ml de milieu autoinductible en ajoutant 2 mM MgSO₄ et 100 µg/ml ampicilline (236). Après 16-18 heures de croissance à 37°C, les cellules ont été récoltées et remises en suspension dans un tampon de lyse (50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 10mM imidazole avec un ajout des inhibiteurs de protéase de Pierce). Du lysozyme a été ajouté à 1 mg/ml et la solution a été incubée sur glace pendant 30 min. Cette étape a été suivie de 6 impulsions de sonication (10 secondes) séparées par des intervalles de 10 secondes et d'une centrifugation à 20.000 x g pendant 20 min. Le lysat a ensuite été centrifugé à 10 000 x g pendant 20 à 30 min à 4°C. Le surnageant a été recueilli et les protéines exprimées ont été purifiées par chromatographie d'affinité Ni-NTA (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Une protéine soluble d'une taille de 41 kDa a été purifiée. La pureté et la surexpression des protéines ont été détectées par SDS-PAGE sur des gels de 14,5 % et visualisées par coloration au bleu de Coomassie. La concentration en protéines a été déterminée à l'aide de la méthode de Bradford et de la fluorimétrie QuBit.

Expériences de retard sur gel (EMSA)

Des expériences de retard sur gel (EMSA) ont été réalisées en utilisant des fragments d'ADN spécifiques préalablement clonés dans pUC19 et qui ont été marqués en effectuant une PCR avec des amorces M13-F et M13-R marquées au 5'-6-HEX. Ces fragments d'ADN marqués (avec une concentration constante de 20 ng) ont été incubés à 37 °C dans un tampon de liaison TENg 1× (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 25mM NaCl, and 5% glycerol), 10µg d'ADN de sperme de saumon et diverses concentrations de recombinases XerH. Après 2h d'incubation, les mélanges réactionnels ont été chargés dans un gel de polyacrylamide natif à 5 % qui avaient été mis sous tension pendant 1 h dans 0,5× Tris-borate-EDTA à 100 V. Les fragments d'ADN ont été visualisés à l'aide d'un imageur Typhoon 9410 et analysés par le logiciel ImageQuant (GE Healthcare).

Réactions avec les substrats suicides

Les substrats utilisés dans cette expérience étaient des substrats suicide contenant une entaille dans soit dans le brin supérieur ou le brin inférieur de la région centrale. Ces substrats suicidaires ont été créés par assemblage de trois oligonucléotides, qui correspondent à un site complet en rassemblant les deux moitiés (gauche et droite), soit du brin supérieur ou inférieur, et soient les brins supérieurs ou inférieurs complets. Pour les substrats demi-sites, seuls deux oligonucléotides ont été utilisés, correspondant au côté gauche ou droit du site *difH*. Le mélange des oligonucléotides a été incubé pendant 2 minutes dans un annealing buffer (10 mM Tris, pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 Mm EDTA) à 95°C. Ensuite, il a été refroidi progressivement à la température de la pièce pendant 45 minutes.

Les réactions de clivage ont été réalisées dans un tampon TDMNG (50mM Tris pH 7,5, 5mM DTT, 75mM MgCl₂, 25mM NaCl et 25% de glycérol) contenant 25 à 30µM d'ADN de substrat ou demi-substrat en présence de 1,25 mM de XerH. Les mélanges ont été incubés pendant 60 min à 37°C. Les réactions ont été arrêtées en ajoutant 5µl du SDS 2% et 5µl de Orange loading dye (NEB), et en chauffant le mélange par la suite à 100 °C pendant 5 min. Les échantillons ont ensuite été chargés dans un gel TBE à 6 % en présence de 0,1 % de SDS. Les gels ont été scannés dans un imageur Typhoon 9410, et les images ont été analysées par le logiciel IMAGEQUANT (GE Healthcare).

Le site de clivage de XerH sur *difH* a été recherché en utilisant des substrats suicides marqués au FITC en 3'. Le mélange de la réaction a été préparé dans 20 µl de tampon TDMNG en présence de concentrations variables de XerH en présence de 10µg d'ADN de sperme de saumon. Après une incubation de 4 heures à 37°C, les réactions ont été arrêtées en utilisant avec 20µl de formamide, incubé le mélange à 75°C pendant deux minutes. Les échantillons ont ensuite été chargés dans un gel polyacrylamide à 20% avec de l'urée 6M, et scannés avec un imageur Typhoon. Les échelles de poids moléculaire ont été préparées par dégradation chimique des oligonucléotides 3' marqués au FITC selon le protocole de séquençage chimique G+A (237).

Résultats

Activité de liaison de XerH sur les mutants *difH*

Afin de confirmer la formation d'un complexe stable entre la recombinase XerH et le site *difH*, la liaison de XerH à ce site a été testée par EMSA. La protéine XerH de *C. jejuni* a été surexprimée et purifiée sous forme de protéine de fusion 6x-His pour être utilisée dans des tests de liaison avec le site *difH*. Le site de recombinaison a été amplifié et marqué au 5' 6-HEX par PCR. Une quantité constante d'ADN marqué a été incubée à 37°C avec XerH comme décrit dans Matériel et Méthodes. Pour éviter les interactions non spécifiques, de l'ADN de sperme de saumon a été ajouté à chaque réaction. La liaison au site *difH* a été détectée, et deux bandes retardées ont été observées (Figure 14).

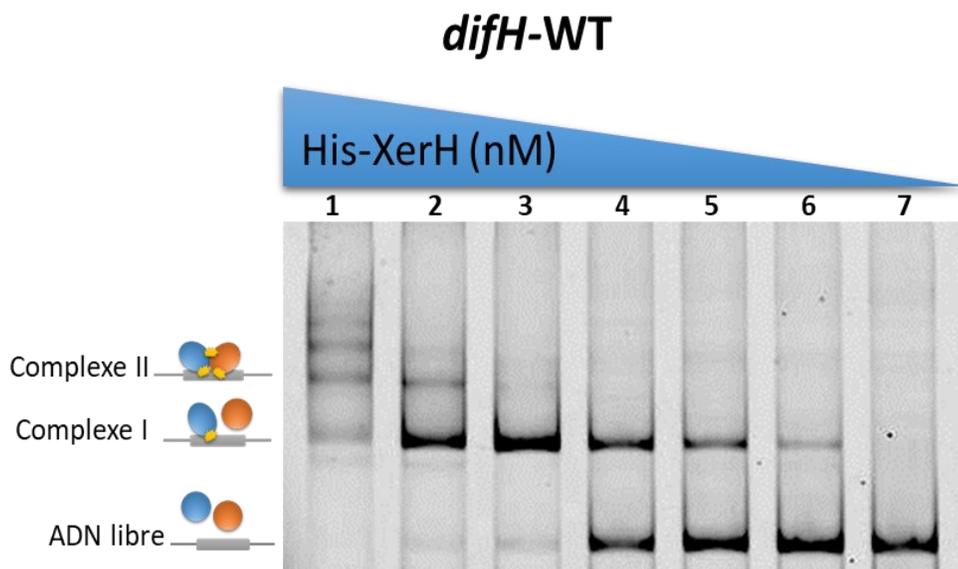


Figure 14. – Formation du complexe XerH-*difH* par EMSA.

Les bandes observées correspondent à l'ADN libre, l'ADN lié à un monomère de XerH, ou l'ADN lié à deux monomères de XerH comme indiqué par les schémas sur le côté gauche du gel. Tous les gels contenaient des dilutions de la protéine XerH à un facteur de 2, allant de 2680 nM (puits 1) à 42 nM (puits 7). 20 ng de produit PCR purifié ont été utilisés dans chaque réaction de liaison.

En raison de leur taille supérieure à celle de l'ADN seul, les complexes XerH-ADN devraient présenter une migration plus lente sur un gel en position plus élevée. Dans cette expérience, deux complexes plus grands sont apparus de manière séquentielle : à des concentrations de protéines plus faibles, un seul complexe (bande inférieure) a été formé, tandis que lors de l'ajout d'une quantité supérieure de XerH, la bande d'ADN libre a disparu et le second complexe (bande supérieure) est apparu. Le fragment retardé migrant plus lentement représente deux recombinases liées au site *dif* et est à peine visible à une concentration de 670 nM (Figure 14, puits 3) ; le fragment retardé migrant plus rapidement est visible à toutes les concentrations utilisées, sauf à 2680 nM (Figure 14, puits 2 à 6) et représente une recombinase liée à un seul côté du site. À la plus forte concentration de XerH de 2680 nM (Figure 14, puits 1), la bande supérieure était la plus importante des deux complexes et tout l'ADN libre a disparu. L'apparition des bandes supplémentaires à fortes concentrations de XerH est probablement due à des interactions non spécifiques entre l'ADN et la protéine. La liaison des deux monomères semble être coopérative étant donné que le complexe de dimères a été formé efficacement même avec des rapports protéine/ADN qui ne saturent pas le complexe monomère.

Cette réaction a été déjà mise en évidence par Leroux et al. (156). Les résultats obtenus ci-dessous seront comparés avec celui-là.

1. Mutations introduites dans le site *difH*

Afin d'élucider davantage les régions du site *difH* qui sont spécifiquement requises pour une liaison ainsi qu'un clivage efficace, et éventuellement de mettre en lumière les séquences indispensables pour ces réactions, une analyse de la réaction de liaison de XerH sur des sites *difH* mutés a été réalisée par EMSA. Le choix des nucléotides mutés a été basé sur deux paramètres : leur degré de conservation chez les bactéries et leurs influences sur les réactions de recombinaison d'autres systèmes Xer. Les mutations ont été introduites dans le site *difH* par mutagenèse dirigée. Le site *difH* cloné dans pUC19 a été amplifié par PCR en utilisant des amorces avec des sites *difH* mutés (Tableau 2). Les produits obtenus après traitement avec le kit de

mutagenèse dirigée fourni par NEB ont été incubés avec la protéine XerH. Les mutations choisies pour être introduites dans le site *difH* sont présentées dans la Figure 15.

WT	ATTTTGTATTGAAAAC T GTAA TTTTC AAACTTTTTTA
M1	ATTTT AAT ATGAAAAC T GTAA TTTTC ATT GA TTTTTA
M2	ATTTTGTAT A GAAAAC T GTAA TTTTC TA ACT TTTTTA
M3	ATTTTGTATT C AAAAC T GTAA TTTTC AAACTTTTTTA
M4	ATTTTGTATTG T AAACTGTAA TTTTC AAACTTTTTTA
M5	ATTTTGTATTG A TA ACT GTAA TTTTC AAACTTTTTTA
M6	ATTTTGTATTGA A T ACT GTAA TTTTC AAACTTTTTTA
M7	ATTTTGTATTGAA A T CT GTAA TTTTC AAACTTTTTTA
M8	ATTTTGTATTGAAA A G T GTAT TTTTC AAACTTTTTTA
M9	ATTTTGTATTGAAA A C CTGC ATTTTCAA ACT TTTTTA
M10	ATTTTGTATTGAAA A C TGC ATTTTCAA ACT TTTTTA
M11	ATTTTGTATTGAAAA A CTGTAA TTTTC AAACTTTTTTA

Figure 15. – Séquences des mutations introduites dans le site *difH*.

Le site original de *difH* de *C.jejuni* a été utilisé comme base pour la mutagenèse. Seul le brin supérieur est représenté. Les nucléotides conservés de *difH* sont représentés en bleu. Les nucléotides en rouge sont mutés par rapport à la séquence originale présentée en haut (WT).

Plusieurs études ont montré l'importance de certains nucléotides conservés du site *difH* dans la réaction de liaison et de clivage de XerH. Cette importance nous a encouragé à choisir ces nucléotides comme cible de mutation pour tester leurs effets sur l'interaction de XerH avec *difH* (liaison et clivage). Ces mutations ont été classées en trois groupes : mutations au niveau des

séquences de liaison (M1 et M2), mutations au niveau du site de clivage (M3, M4 et M5) et mutations au niveau de la région centrale (M6, M7, M8, M9, M10 et M11) du *difH*.

Les mutants créés par mutagenèse dirigée ont été testés. Les onze expériences EMSA ont été réalisées en utilisant la même gamme de concentration de protéine qui assurait une liaison totale de XerH à *difH-WT* allant de 42 à 2680 nM, avec des concentrations égales d'ADN (20ng/μL) et de sperme de saumon (10ng/μL). Les mêmes conditions de réaction ont été respectées.

2. Modification des sites de liaison

Chez toutes les bactéries qui utilisent le système de recombinaison Xer, la recombinase Xer doit être en contact étroit avec les deux bras de l'ADN afin qu'elle puisse commencer la réaction de clivage. En effet, les séquences du site *dif* consacrées pour la liaison semblent être parmi les plus conservées chez les bactéries. Ceci nous a amené à introduire des mutations dans ces séquences en modifiant les nucléotides conservés faisant partie des bras de liaison utilisés par XerH pour se fixer sur *difH*. Deux mutations du site de liaison de XerH sur *difH* (M1 et M2) ont été choisies en se basant sur les résultats trouvés par d'autres auteurs montrant leur influence sur l'interaction entre XerH et *difH* chez *H.pylori* ainsi qu'entre XerS et *difSL* de *S.suis*. Les résultats obtenus sur le gel SDS-PAGE en utilisant les sites mutés *difH*(M1) et *difH*(M2) sont présentés dans la Figure 16.

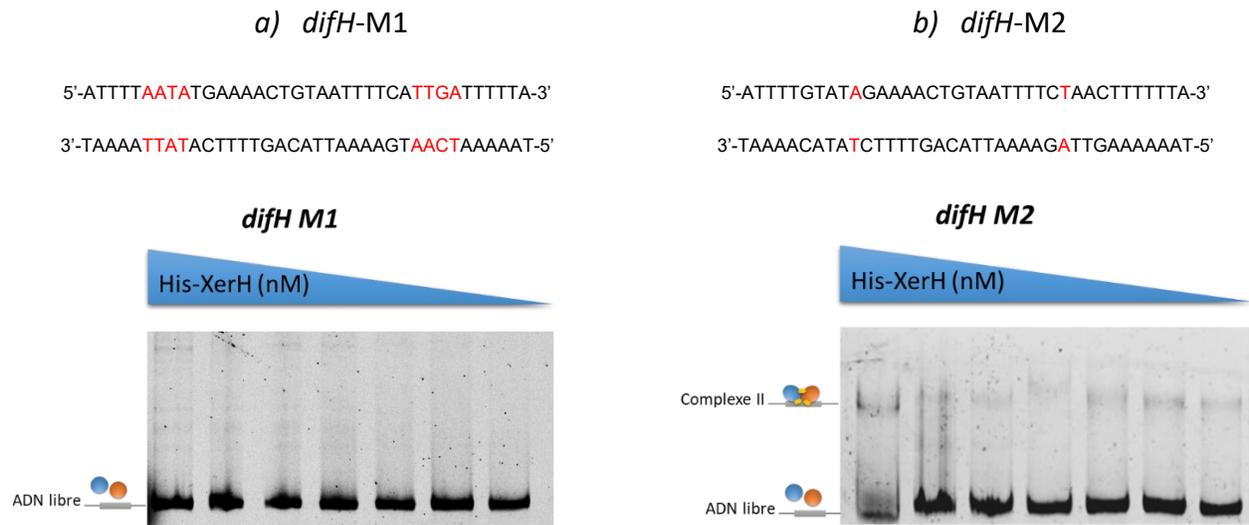


Figure 16. – Effet des mutations introduites au niveau du site de liaison de *difH*

a) Mutation M1 dans *difH*-M1. b) Mutation M2 dans *difH*

Les mutations introduites dans le site de liaison ont touché essentiellement les nucléotides qui ont été identifiés comme indispensables à la liaison d'autres systèmes Xer chez d'autres bactéries à savoir la mutation M1 (AATA au lieu de GTAT) avec laquelle 4 nucléotides du bras gauche et droit ont été touchés (Figure 15). Les résultats de migration sur gel étaient surprenants : aucun produit de liaison n'a été détecté sur gel ce que signifie que cette mutation abolit complètement la réaction de liaison de XerH sur *difH*. Ce résultat n'a jamais été observé avec d'autres systèmes Xer. La deuxième mutation M2 du *difH* qui a été choisie pour être testé en présence de XerH a touché la thymine T7', celui qui est adjacent au site de clivage prédit de la recombinase XerH. La mutation de ce nucléotide a bloqué la réaction de clivage chez *H.pylori* ce qui prouve son importance pour achever la réaction de recombinaison. Le résultat du EMSA a révélé la formation d'un faible complexe II et une présence indétectable du complexe I.

3. Modification du site de clivage

Il existe une corrélation entre la courbure de l'ADN et l'activité de clivage, un facteur critique pour les recombinases à tyrosine et particulièrement important pour les recombinaisons à une seule protéine. Cette notion fait de la réaction de liaison un facteur déterminant pour accomplir la réaction de clivage d'où l'importance de trouver les nucléotides déterminants pour la liaison de XerH au niveau du site de clivage. Pour tester l'effet spécifique du changement d'une seule paire de base au niveau de site de clivage, la mutation M3 a été créée. Des mutations avec d'autres paires de bases situées au niveau du site de clivage ont été conçues (M4 et M5). L'effet de ces modifications a été observé sur les gels de la Figure 17.

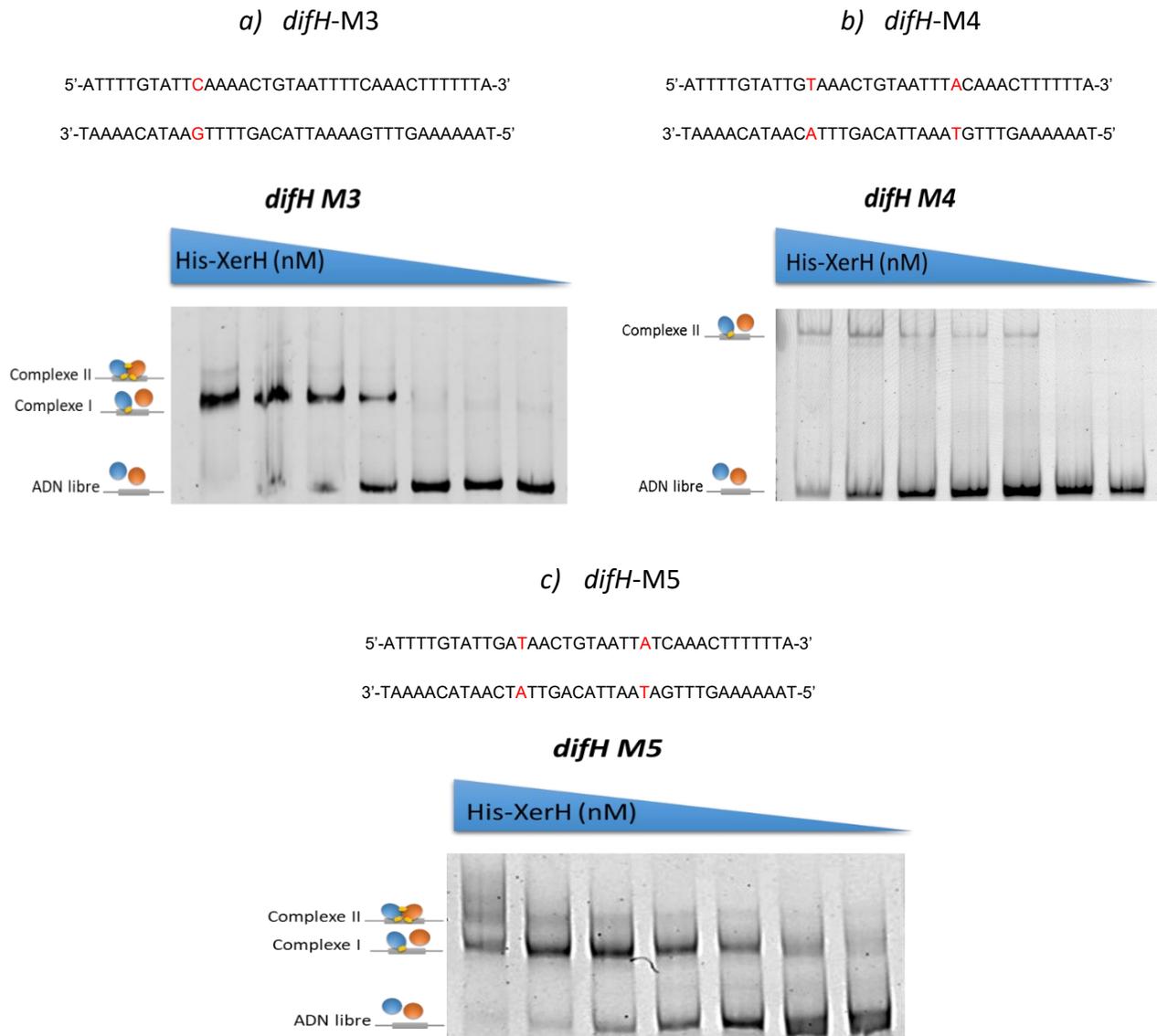


Figure 17. – Effet des mutations introduites au niveau du site de clivage de *difH* (M3, M4 et M5)

Le site de clivage précis de la recombinase XerH sur le site *difH* chez *C.jejuni* est toujours inconnu. Une comparaison de son système avec celui des autres bactéries apparentées, nous a servi à prédire dans quelle région de la séquence *difH* ce site pourrait être. Pour cette raison, nous avons choisi de créer les mutations M3, M4 et M5 en émettant l'hypothèse que XerH clive *difH* dans cette région. En analysant les résultats obtenus, nous avons remarqué : une réduction de la

formation du complexe II en présence de la mutation M3; de même, il semble que les modifications introduites en créant la mutation M4 inhibent la formation du complexe I et seul le complexe II était capable d'apparaître (donc une plus grande quantité d'ADN libre en bas des gels); en présence de la mutation M5 le profil de migration des bandes est similaire à celui observé avec un site *difH* non muté.

4. Modification de la région centrale

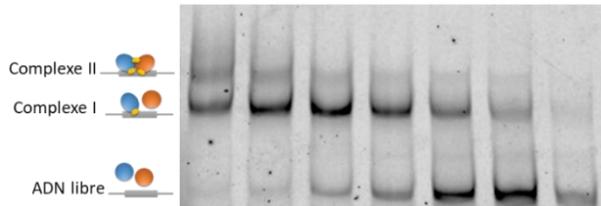
La séquence du nucléotide de la région centrale adjacente au site de clivage a été étudiée par plusieurs auteurs vu son importance pour définir l'ordre de clivage et d'échange de brin au cours de la recombinaison. Différentes mutations ont été étudiées au niveau de la région centrale de *difH* en modifiant 2 nucléotides à la fois dans chaque mutation (M6, M7et M8). Quatre nucléotides ont été touchés pour créer la mutation M9. En ce qui concerne la mutation M10, un site de restriction correspondant à l'enzyme *PstI* a été créé au milieu de la région centrale. La mutation M11 a été choisie pour être étudiée en visant à créer un site de recombinaison plus large que le site conventionnel. Un tel site pourrait donner plus d'espace à la recombinase XerH pour s'installer et se lier au site *difH* ce qui pourrait améliorer la réaction de clivage. Les résultats obtenus en modifiant la région centrale sont illustrés dans la Figure 18.

a) *difH*-M6

5'-ATTTTGTATTGAA**T**ACTGTAAT**A**TTCAAAC**T**TTTTTA-3'
3'-TAAACATAACT**T**ATGACATT**A**AGTTTGAAAA**A**AAT-5'

difH M6

His-XerH (nM)

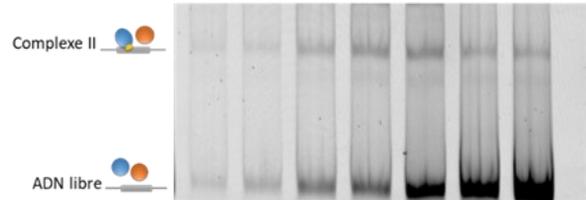


b) *difH*-M7

5'-ATTTTGTATTGAAA**T**CTGTAA**A**TTCAAAC**T**TTTTTA-3'
3'-TAAACATAACT**T**AGACATT**T**AAAGTTTGAAAA**A**AAT-5'

difH M7

His-XerH (nM)

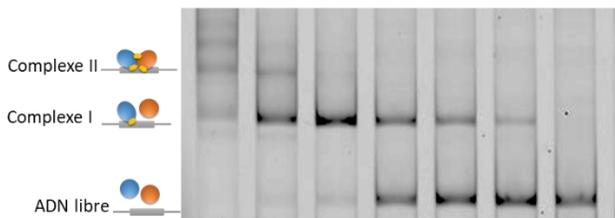


c) *difH*-M8

5'-ATTTTGTATTGAAA**G**TGTAT**T**TTTCAAAC**T**TTTTTA-3'
3'-TAAACATAACT**T**TTT**C**ACAT**A**AAAAGTTTGAAAA**A**AAT-5'

difH M8

His-XerH (nM)

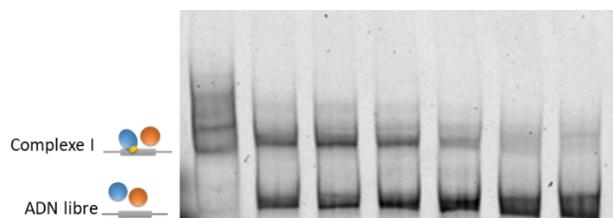


d) *difH*-M9

5'-ATTTTGTATTGAAA**A**C**T**GCATTTTCAAAC**T**TTTTTA-3'
3'-TAAACATAACT**T**TTG**G**AC**G**TAAAGTTTGAAAA**A**AAT-5'

difH M9

His-XerH (nM)



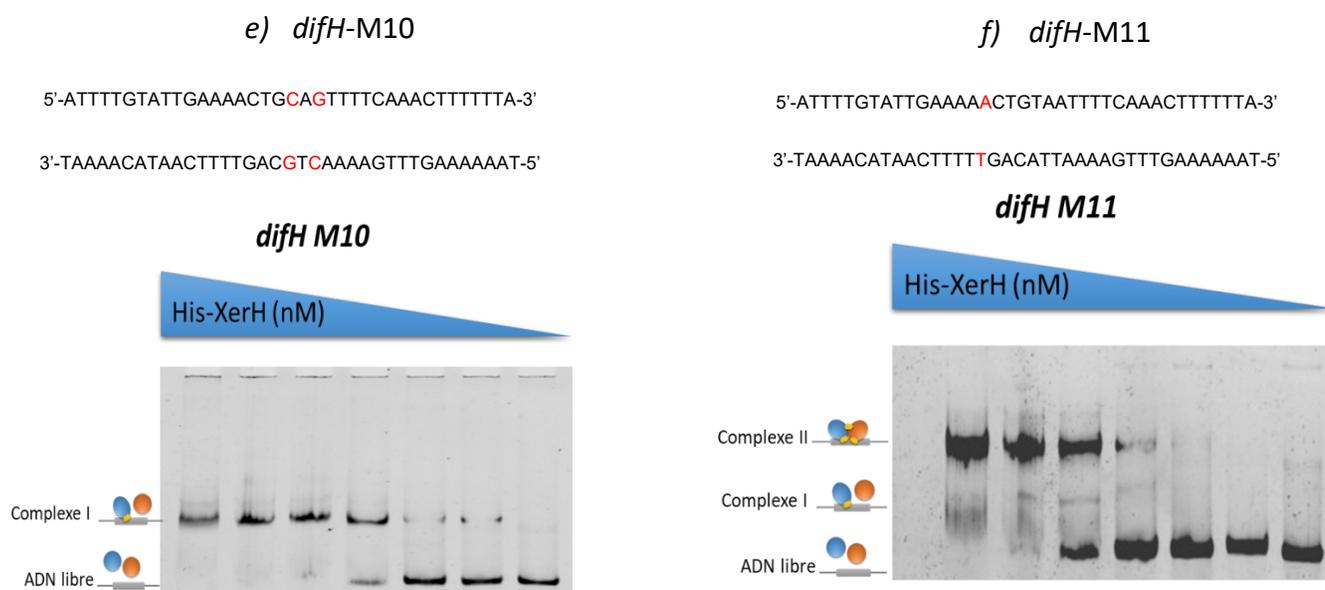


Figure 18. – Effet des mutations introduites au niveau de la région centrale de *difH* (M6, M7, M8, M9, M10 et M11)

La région centrale du site *difH* est riche en AT. Ceci se traduit par une meilleure capacité de séparation des brins, ce qui est considéré comme un élément positif pour le clivage. La région centrale de *difH* est très probablement paire et bien que la taille de l'espaceur de *difH* n'ait pas encore été prouvée expérimentalement, l'importance de cette région dans la réaction de liaison est considérable vu que les régions les mieux conservées dans *difH* sont celles situées à l'intérieur, près de la région centrale. L'analyse des mutations introduites dans la région centrale montre que la modification de deux nucléotides de la région centrale de *difH* (M6, M8 et M9) sous la saturation de XerH (2680 nM) n'a pas influencé la réaction de liaison. Un profil d'interaction similaire à celui obtenu avec *difH*-WT, avec une formation presque égale des complexes I et II a été observée. Des exceptions ont été remarquées avec les liaisons de XerH avec des sites *difH* ayant les mutations M7, M10 et M11. La mutation M7 touche un nucléotide hautement conservé, donc sa mutation donne un profil de migration qui montre des complexes d'ADN libre persistants avec la disparition du complexe I et l'apparition du complexe II avec une faible intensité. Alors qu'une réaction de liaison plus faible a été remarquée en présence de la mutation M10 (création

d'un site de clivage *Pst*I au sein du site), une réaction plus forte a été détectée en insérant une purine de plus dans la séquence de *difH*. Le produit de cette réaction donne un complexe I faible alors que le complexe II est fortement exprimé.

Activité de XerH sur les substrats suicide *difH*

La réaction de clivage a été réalisée en utilisant des substrats suicides « entaillés » marqués au Hex et des protéines His6-XerH. Les substrats étaient formés de trois oligonucléotides qui simulaient la séquence *difH*, contenant soit une entaille supérieure (TN) (à gauche), soit une entaille inférieure (BN) (à droite) (Figure 19). Cette réaction conduit à la formation d'un complexe covalent stable résistant au SDS dans des conditions dénaturantes (1% SDS et traitement thermique à 100°C). Tous les substrats ont été marqués en 5' avec du 6-Hex (indiqué par le *). Le substrat « Top nicked » est marqué en haut à gauche, tandis que le substrat de suicide « Bottom nicked » est marqué en bas à droite.

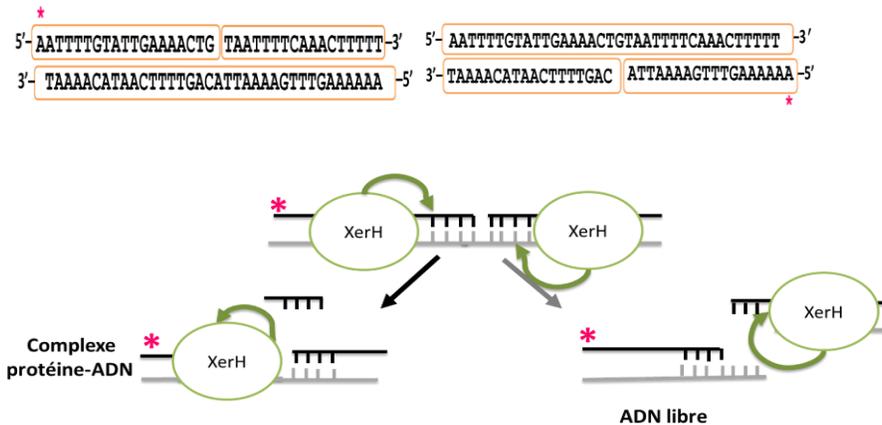


Figure 19. – Représentation schématique des substrats suicides

Lors du clivage, quelques nucléotides sont séparés du brin d'ADN et se diffusent à l'extérieur du complexe. Par conséquent, aucun hydroxyle libre en 5' de l'ADN n'est disponible pour poursuivre ou inverser la réaction et le complexe libéré pourrait être détecté (Figure 20).

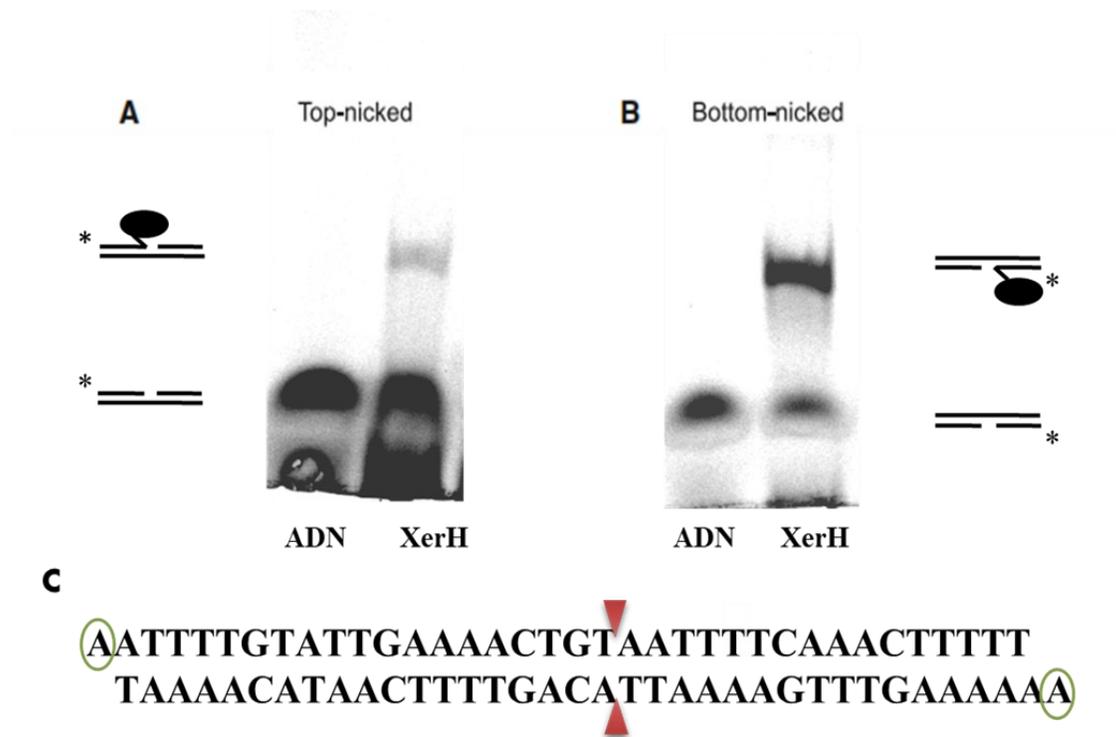


Figure 20. – Activité de XerH sur les substrats de suicide

Les substrats sont constitués de 3 oligonucléotides annelés, contenant soit une entaille supérieure, soit une entaille inférieure (la position de l'entaille est indiquée par le triangle central dans (C)). (A) Le substrat à entaille supérieure (TN) était marqué 5' 6-HEX au niveau du résidu A encerclé sur le brin supérieur ; (B) Le substrat à entaille inférieure (BN) était marqué 5'-6-HEX au niveau du résidu A encerclé sur le brin inférieur.

Seul le complexe ADN-protéine obtenu sera présenté dans les résultats décrites ci-dessous, toutes les autres conditions sont identiques pour tous les gels. Les produits de clivage de *difH*-WT et des mutants de *difH* sont présentés dans la Figure 21.

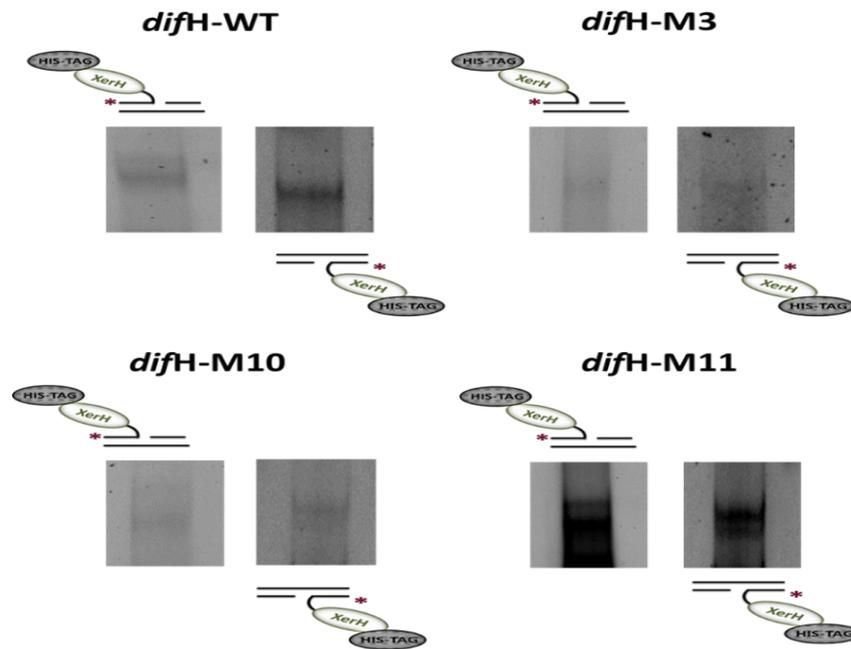


Figure 21. – Comparaison des produits de clivage entre *difH*-WT et trois mutants de *difH*

Les modifications touchent le site de clivage(M3) et la région centrale (M10 et M11).

Comme le complexe libéré comprend un lien covalent entre la protéine et l'ADN, la présence d'une bande montre l'efficacité du clivage de l'ADN par XerH. Les résultats montrent que la protéine XerH purifiée est efficace pour le clivage des deux bras du site *difH* (Figure 21). En outre, ces résultats montrent que le clivage est plus efficace sur le brin inférieur (clivage réalisé par le monomère lié au bras gauche de la *difH*) que celui du brin supérieur (clivage réalisé par le monomère lié au bras droit *difH*). Les mutations introduites ont influencé la réaction du clivage du XerH sur *difH*. La mutation M3 (mutation du site de clivage) a bloqué le clivage sur les deux brins soit supérieur et inférieur. Aucune bande n'a été détectée lors de cette réaction. De même, en insérant un site de restriction *Pst*I au niveau de la région centrale du site *difH* (Figure 15), la réaction de clivage a été inhibée ce qui explique la faible intensité des bandes présentes sur gel. Seule la mutation M11 a amplifié la réaction de clivage, une bande plus dense montre que l'insertion d'un nucléotide au niveau de la région centrale du site *difH* peut améliorer la liaison de la recombinase en offrant un site plus grand ce qui donne une meilleure capacité de la protéine à cliver le site *difH*.

D'autres expériences ont été effectuées en utilisant des substrats suicides TN ou BN contenant un marqueur 3' FITC afin de repérer le site de clivage de XerH sur *difH*. Des réactions contenant une concentration constante de 115 nM de substrat et une quantité croissante de XerH allant de 1,1, à 4,4 mM ont été incubés pendant quatre heures avant l'électrophorèse sur un gel de polyacrylamide TBE-6M Urée à 20%. Les marqueurs de taille qui ont été utilisés ont été générés par dégradation chimique de l'oligonucléotide approprié marqué au 3'-FITC. Malheureusement, après plusieurs tentatives, le site de clivage de XerH sur *difH* n'a pas pu être identifié.

Activité de XerH sur les demi-sites *difH*

Les demi-substrats suicides étaient formés de « l'*annealing* » de deux oligonucléotides (Tableau 2), correspondant soit à la moitié gauche du site, soit à la moitié droite du site. Le demi-site gauche était marqué 5' 6-HEX au premier nucléotide des bases consensuelles sur le brin supérieur, le demi-site droit était marqué 5'-6-HEX au dernier nucléotide du brin inférieur. Les résultats obtenus avec les demi-substrats suicides sont présentés dans la Figure 22.

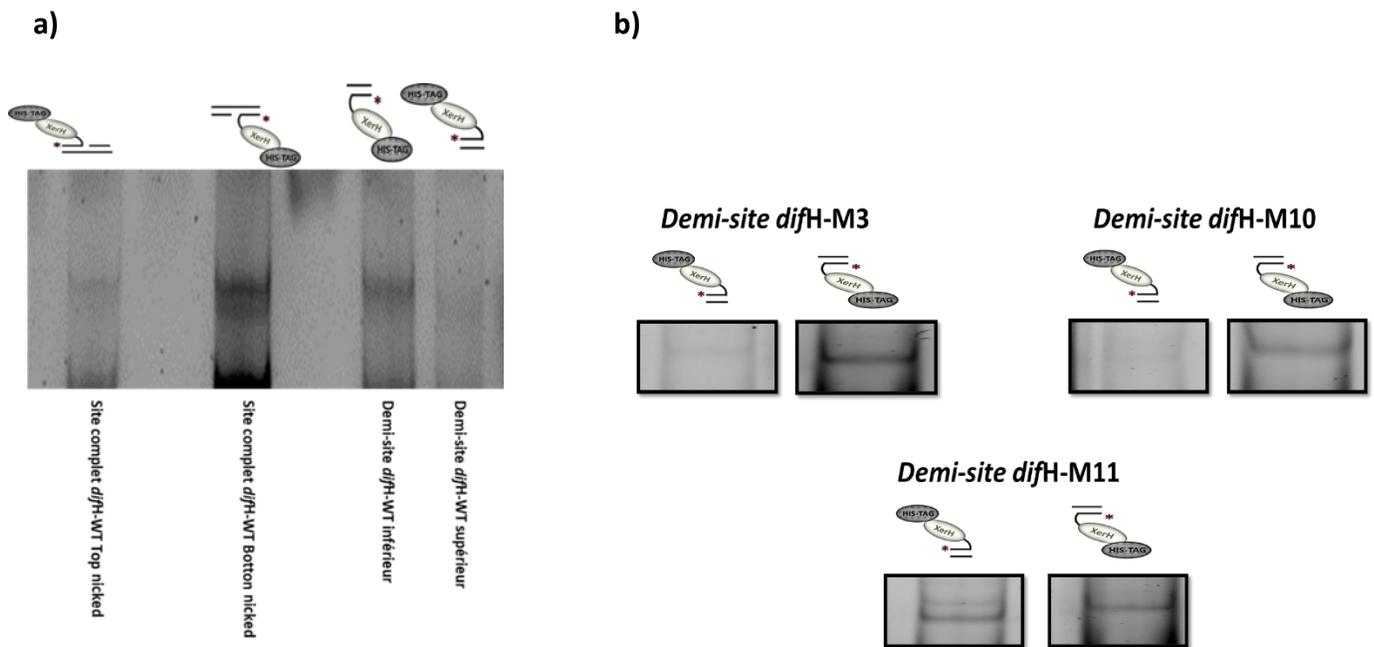


Figure 22. – Activité de XerH sur le site complet et les deux moitiés-site droite et gauche du *difH* et des mutants M3, M10 et M11

Dans le système XerH/*difH*, le bras gauche est celui qui possède la liaison et le clivage préférentiels. L'étude des mutants avec leurs demi-sites respectifs seuls, soit à gauche, soit à droite, a montré que les deux premières mutations (M3 et M10) n'ont pas affecté la préférence de liaison alors que celle qui correspond à une insertion d'un nucléotide au niveau de la région centrale (M11) a amélioré la liaison au niveau du demi-site droit (Figure 22b). Il semble raisonnable de penser que ce nucléotide a pu augmenter la spécificité de XerH pour le demi-site droit et que sa modification affecte donc la liaison de manière significative.

Les résultats des effets causés par les mutations introduites dans le site *difH* sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 3).

Tableau 3. – Synthèse des mutations et de leurs effets sur la réaction de liaison et de clivage

	Mutation	Effet sur la liaison	Effet sur le clivage
Modification des sites de liaison	<i>difH</i> -M1 GTAT → AATA	Abolition complète de la liaison	Clivage bloqué selon(72))
	<i>difH</i> -M2 TTGA → TGA	Absence du complexe I et apparition d'un faible complexe II	Clivage bloqué selon (72)et faible clivage selon (238)
Modification du site de clivage	<i>difH</i> -M3 TGAA → TCAA	Réduction de la formation du complexe II	Clivage bloqué sur les deux brins
	<i>difH</i> -M4 GAAA → GTAA	Inhibition de la formation du complexe I	Clivage bloqué selon(72,155)
	<i>difH</i> -M5 AAAA → ATAA	Aucun effet	Clivage bloqué selon(72,155)
Modification de la région centrale	<i>difH</i> -M6 AAAC → ATAC	Aucun effet	Clivage bloqué selon(72,155)
	<i>difH</i> -M7 AAAC → AATC	Disparition du complexe I et apparition d'un faible complexe II	Clivage bloqué selon (155) et faible clivage selon(72)
	<i>difH</i> -M8 AACT → AAGT	Aucun effet	Clivage bloqué selon (155) et aucun effet selon (72)
	<i>difH</i> -M9 TGTA → CTGC	Aucun effet	Aucun effet selon (72)
	<i>difH</i> -M10 GTAA → GCAG	Apparition d'un faible complexe I et absence du complexe II	Clivage inhibé sur les deux brins
	<i>difH</i> -M11 AACT → AA ^A CT	Apparition d'un faible complexe I et un complexe II fortement exprimé	Meilleur clivage sur les deux brins

Discussion

Les recherches effectuées dans le cadre de cette maîtrise ont permis d'étudier les différents mécanismes de la recombinaison de XerH de *C.jejuni* sur le site *difH*. La recombinase XerH est responsable de la résolution des dimères de chromosomes qui surviennent fréquemment lors de la réplication du génome(23), et il a également été démontré que ce système joue un rôle très important dans la décaténation du chromosome de *C.jejuni* (155,156).

Pour comprendre le mécanisme spécifique de la recombinaison XerH/*difH*, cette étude s'est focalisée sur les particularités du système Xer qui requièrent une seule protéine recombinase, en particulier comment ce système peut être réglé en termes de liaison et de clivage, ainsi que les facteurs nécessaires pour que la réaction de recombinaison soit complète. Plus précisément, le but était de déterminer quelles sont les exigences exactes d'un site de recombinaison *difH* fonctionnel et comment XerH interagit avec ce site.

Les expériences réalisées dans ce mémoire ont démontré que XerH peut se lier spécifiquement à *difH* et que cette liaison est coopérative. La réaction de liaison est symétrique et presque équivalente pour les deux moitiés du site *difH*. Contrairement à la liaison, la réaction de clivage est hautement asymétrique puisque XerH en position 333, qui forme des complexes covalents avec l'ADN, clive préférentiellement le brin d'ADN inférieur.

Nos expériences ont également démontré que les nucléotides de la région externe du *difH*, conçus pour la liaison, semblent être déterminants pour établir cette réaction, puisqu'ils provoquent l'abolition de la liaison lorsqu'ils sont mutés, un résultat rapporté pour la première fois chez les bactéries qui utilisent le système de recombinaison à une seule recombinase. De plus, les modifications de nucléotides hautement conservés dans le site de clivage ainsi que dans la région centrale inhibent remarquablement la liaison de XerH sur *difH*, ainsi que la réaction de clivage. Alors qu'un site *difH* plus grand a permis d'avoir une réaction de liaison et de clivage plus importante ce qui prouve l'importance du nucléotide supplémentaire au niveau de la région centrale du *difH*.

XerH de *C.jejuni* a été surexprimée et purifiée avec succès dans *E. coli*. La protéine purifiée s'est liée efficacement à son site d'ADN prévu *difH*. Cette réaction a été mise en évidence par EMSA.

Le site *difH* de 29 pb précédemment identifié et étudié chez *C.jejuni* (Figure 10)(156) est apparu plus court que les autres sites *dif* connus (entre 28 et 34 pb)(24,150,154,155) ou même que les sites d'autres recombinases à tyrosine (par exemple, le site *loxP* de la Cre a une longueur de 34 pb)(239). L'expérience EMSA (Figure 14) a révélé un schéma de liaison XerH/*difH*, indiquant que deux monomères de XerH se lient séquentiellement aux deux bras *difH*. La liaison des deux monomères semble être coopérative, car le complexe dimérique est bien formé, même à des rapports protéine/ADN faibles qui ne saturent pas le complexe monomérique. Malheureusement, les niveaux de coopérativité n'ont pas pu être précisément évalués à partir du gel EMSA et d'autres méthodes permettant de mesurer l'affinité pour l'ADN nu ou lié à un monomère n'ont pas été utilisées dans cette étude (comme la calorimétrie par titrage isotherme ou la thermophorèse). Ces résultats concordent avec ceux trouvés par Leroux et al. chez *C. jejuni* et par Bebel et al. chez *H. pylori* (72,156).

Les systèmes XerH/*difH* de *C. jejuni* et de *H. pylori* diffèrent des autres systèmes Xer puisque les deux demi-sites de liaison sont très similaires autour de la région centrale et distincts à l'extérieur. Cependant, XerH peut reconnaître les deux moitiés avec une affinité égale (156) et il y a une forte probabilité que la liaison du bras gauche soit une condition primordiale pour un assemblage correct et fonctionnel du complexe synaptique et la liaison au demi-site droit ne puisse se produire que si le demi-site gauche, où la constante de dissociation est beaucoup plus faible que celle du côté droit, est déjà occupé(37).

Afin de déterminer quelles parties de *difH* sont indispensables à la recombinaison avec XerH et de mieux comprendre le mécanisme de régulation de XerH, une analyse des mutations de *difH* a été effectuée. Chez *H. pylori*, XerH a été en contact très étroit avec *difH*, formant un complexe serré en forme de C autour de chaque bras du site *difH*. La majorité des interactions de XerH se produisent entre l'hélice αK et la partie extérieure du *difH*(37). Ceci nous a permis de mieux comprendre comment XerH de *C.jejuni* pourrait interagir avec *difH*. Il était prévu que les deux mutations introduites dans la région de liaison externe du site *difH* diminuent sa liaison avec XerH

(37,238), mais surprenamment, lorsque nous avons effectué cette expérience en créant la mutation M1 (AATA au lieu de GTAT), la liaison de XerH était complètement abolie alors que la mutation M2 l'a gravement diminuée (Figure 16). Ceci suggère que ces nucléotides hautement conservés du bras gauche du *difH* pourraient être impliqués dans de tels contacts et qu'ils sont cruciaux pour fournir un environnement favorable aux interactions correctes avec XerH puisqu'ils sont conservés chez les bactéries apparentées à *C.jejuni* (155). Ceci concorde avec les autres études menées sur *H.pylori* et *S.suis* sur l'importance des nucléotides externes pour la spécificité de la liaison(37,155,238) et la même caractéristique a été trouvée dans le système XerCD/*dif* de *E. coli* et le système FLP/FRT de *S. cerevisiae*, dont les nucléotides critiques pour la liaison sont situés dans la région la plus externe de *dif* et FRT respectivement(240,241). Il faut souligner l'importance de ce résultat, car c'est la première fois qu'une inhibition complète de la liaison de XerH par une mutation spécifique est rapportée. Cela suggère que les principaux déterminants de la liaison de XerH sont situés dans cette région. Il a déjà été établi que le remplacement des A par des T à la même position des mutations M4 et M7 va bloquer la recombinaison *in vivo* chez *H.pylori*, fort probablement en empêchant la liaison par XerH (155). Mais, ces mutations ont réduit légèrement l'efficacité de la liaison ce qui a provoqué la disparition du complexe I, mais a maintenu le complexe II avec une faible concentration (Figure 17b et 18b). Des études permettant de déterminer à quelle étape de la recombinaison ces mutations interfèrent devront être réalisées pour comprendre pleinement l'importance de ces nucléotides sur l'efficacité de liaison.

La richesse du site *difH* en A/T est une caractéristique essentielle, surtout à proximité du phosphate scissile, qui facilite la courbure de l'ADN bicaténaire en raison de la présence d'un sillon mineur étroit produit par ces régions riches en A/T (242). Cependant, la modification effectuée sur cette région, comme M3, n'a pas modifié la réaction de liaison alors qu'elle a bien aboli la réaction de clivage du brin supérieur et inférieur, ceci concorde avec les résultats de Guo et al. qui ont démontré que la même séquence du nucléotide du système de recombinaison Cre est primordial pour définir l'ordre de clivage et d'échange de brins (243). L'ajout d'une purine à la région centrale (mutation M11) a amélioré la réaction de liaison et de clivage intrinsèque de XerH pour le brin supérieur et inférieur (Figure 18f et 21). Les mutations M5, M6, M8 et M9 n'a aucune

influence sur la liaison de XerH sur *difH*, ce qui laisse donc présager qu'ils ne sont pas importants pour la spécificité de liaison de XerH.

Contrairement à la liaison, le clivage au niveau de substrats suicides est hautement asymétrique. Les substrats piègent l'intermédiaire covalent entre XerH et l'ADN *difH* (qui est autrement instable et est normalement immédiatement converti en d'autres intermédiaires ou en substrats), ce qui permet de visualiser le clivage. Le test de clivage en utilisant les substrats suicide a déjà été utilisé pour caractériser d'autres tyrosine recombinases (244,245). Par conséquent, la capacité de XerH à former des produits en utilisant cette technique suggère que XerH utilise le même mécanisme ou un mécanisme équivalent que les autres tyrosine recombinases. La protéine XerH obtenue a déjà démontré une activité de clivage sur des substrats suicide du site *difH*. Mais il faut prendre en considération que l'utilisation des substrats suicides n'est pas nécessairement un reflet exact de la réalité. En raison de leur petite taille et de leur degré de liberté, les substrats suicide peuvent acquérir une plus grande variabilité de conformations ce qui pourrait faciliter un clivage, difficile à réaliser différemment (153). Le clivage par XerH n'est pas égal sur les deux brins des substrats suicides. Un clivage plus efficace au niveau du brin inférieur a été observé (Figure 21). Puisqu'un clivage préférentiel est observé pour XerCD, il semble donc que cette propriété est importante pour toutes recombinases de type Xer (37,238). L'asymétrie du clivage par XerH peut avoir une origine différente de celle causée par la recombinase Cre. En effet, dans le cas de Cre, c'est la nature de la base en 5' du site de clivage qui détermine la préférence pour le clivage d'un brin par rapport à l'autre (246–248). Ceci ne peut être le cas pour XerH, puisque le site *difH* est palindromique tout autour de l'espaceur. Mais, une mutation M3 a été créée en émettant l'hypothèse que le G en cette position est déterminante pour la réaction de clivage. Il a déjà été établi que la recombinaison a été fortement inhibée en remplaçant ce nucléotide par un C (155). Nos résultats ont montré que la mutation de ce nucléotide a inhibé le clivage du *difH* par XerH (Figure 20). Ce clivage était aussi influencé par les deux mutations M10 et M11 introduites dans la région centrale de *difH* ce qui signifie que les nucléotides qui sont situés dans cette position sont essentiels pour établir la réaction de clivage. Il a été montré qu'avoir une région centrale riche en AT pour *loxP* et FRT, pourrait augmenter la capacité de séparation des brins et améliorer le clivage (243,248–251). Vu la ressemblance entre ces deux systèmes et XerH/*difH*, cette

caractéristique (richesse en AT) peut expliquer l'inhibition du clivage causé par la mutation M10(CAG au lieu de TAA) et l'amélioration de l'efficacité du clivage produit lors de l'insertion d'une purine (+A) au niveau de la région centrale du *difH*. De plus, il a été démontré que malgré les similitudes entre les sites de recombinaison *difH* de *C. jejuni* et *difSL* de *S.suis*, les recombinases ne réagissent pas de manière croisée (XerH ne se lie pas à *difSL* et XerS ne se lie pas aux sites *difH*) (Leroux et al., non publié). En ajoutant une purine au niveau de la région centrale de *difH*, on obtient un espaceur qui a la même taille (prédite) que celui de *S.suis*. Donc l'utilisation d'un site *difH* avec un nucléotide de plus pourrait réfuter l'hypothèse que les deux recombinases ne partagent pas le même mécanisme de liaison à l'ADN et peut être prouvé qu'ils pourraient être fonctionnellement homologues

Bebel et al. ont éclairci comment l'asymétrie du site *difH* influence la conformation de la protéine sur le complexe synaptique(37). Cette asymétrie fait en sorte que XerH va donner une courbure spécifique à l'ADN ce qui va favoriser le clivage d'un brin par rapport à l'autre. Donc il se pourrait que nos mutations aient interféré soit en changeant les interactions protéine-ADN, soit en facilitant ou inhibant la courbure de l'ADN. En comparant le système XerH/*difH* avec les autres systèmes (XerCD/*dif* de *E.coli* et Xers/*difSL* de *S.suis*) on peut constater qu'il y a un autre facteur régulateur, autre que l'asymétrie du site *difH*, responsable de l'activation du clivage et l'échange de brin au niveau du brin supérieur, il s'agit de la protéine FtsK. Plusieurs expériences sur FtsK de *C.jejuni* ont été déjà menées au cours de cette étude pour mettre en évidence l'interaction entre les deux protéines XerH et FtsK et leur rôle dans la régulation spatiale et temporelle de la réaction de recombinaison, mais les résultats n'ont pas été présentés en raison du manque de répétition.

Conclusion et perspectives

Pour résumer, cette étude a permis de mieux comprendre les différents mécanismes de la recombinaison XerH et a contribué à une meilleure compréhension générale des systèmes Xer à une seule recombinase en montrant comment les événements de liaison et de clivage peuvent être orchestrés en présence d'une seule recombinase.

Dans cette étude, l'effet de plusieurs mutations introduites à trois niveaux, soit la liaison, le clivage ainsi que la région centrale a été testé. Compte tenu des résultats obtenus à ce jour, il semble que l'asymétrie des sites de recombinaison et l'assemblage du complexe synaptique jouent un rôle important dans la régulation du processus de recombinaison par XerH. Par conséquent, il serait très utile de mener une étude sur la structure cristalline de XerH en complexe avec son substrat d'ADN *difH*. Partant de la structure obtenue, nous pourrions élucider le mécanisme de recombinaison de XerH, en tenant compte des connaissances mécanistiques obtenues pour d'autres recombinaisons Xer. En combinant les approches structurales, biochimiques et microbiologiques, il est possible de caractériser largement les événements de recombinaison au niveau du site *difH*.

Le mécanisme de régulation proposé doit être validé et affiné par des expériences *in vivo*. Il serait possible de tester l'effet de ces mutations lors de la recombinaison *in vivo* (puisque'il a été déjà montré que la recombinaison XerH/*difH* sur plasmide dans *E. coli* fonctionne(156)). Deux plasmides vecteurs compatibles (pACYC184 et pQE30) seront transformés dans *E.coli* (XerC⁻/XerD⁻). Un des deux plasmides aura le gène *xerH* et l'autre aura 2 sites *difH* avec des mutations sélectionnées. Les deux plasmides devraient avoir des gènes de résistance différents pour permettre la sélection. La réaction de recombinaison chez *E.coli* sera suivie pour plusieurs générations par PCR. La perte du gène de résistance sera un indice que la réaction de recombinaison a eu lieu. De même, la partie C-terminale de FtsK sera clonée dans le même plasmide que *xerH* et la réaction de recombinaison sera mise en évidence aussi par PCR chez des bactéries n'ayant ni les recombinaisons XerC et XerD ni le FtsK de *E.coli*. Une partie de cette

expérience a été déjà effectuée au cours de notre étude en clonant quelques sites *difH* mutés dans le plasmide pACYC184,

En ce qui concerne le système XerH/*difH* de *C.jejuni*, le site exact où se produit la liaison et le clivage des brins *difH* est encore inconnu. Plusieurs méthodes sont envisageables pour le mettre en évidence à savoir l'expérience de protection contre la DnaseI. Dans cette expérience, un oligonucléotide *difH* marqué à l'extrémité 5' sera incubé avec XerH. Ensuite, l'ADN lié à XerH subira une digestion par la DnaseI et les échantillons seront analysés sur un gel de séquençage dénaturant à côté d'une échelle de séquençage du substrat. Les résultats feront apparaître une région d'ADN qui n'a pas été digérée par la DnaseI, correspondant au site où XerH était lié. Cette région a pu être digérée en l'absence de XerH, ce qui suggère que le profil de protection observé est directement dû à la liaison de XerH à l'ADN substrat. La séquence de la région liée peut être lue à partir de l'échelle de séquençage exécutée en même temps que les réactions. Une autre méthode plus précise pourrait être utilisée, l'expérience de protection contre les radicaux libres. Cette méthode consiste à utiliser les radicaux libres pour cliver une molécule d'ADN qui est liée à une protéine, suivie de la séparation des produits de clivage sur un gel d'électrophorèse dénaturant pour identifier les sites protégés grâce à la liaison de la protéine sur la molécule d'ADN.

Une autre série d'expériences qui se porterait sur la mutagenèse de la recombinase XerH pourrait être effectuée. Ces expériences serviraient à identifier les régions de la protéine XerH impliquées dans la coopérativité et aussi à déterminer la nature des interactions entre XerH et *difH*.

Dans le cadre de notre projet, des expériences ont été déjà menées pour mieux comprendre le rôle de FtsK dans la régulation de la réaction de recombinaison XerH/*difH*. L'idée était de vérifier s'il y a une interaction entre FtsK et XerH et si cette interaction pourrait influencer la réaction de liaison et de clivage. La région C-terminale de la protéine FtsK a été clonée dans un plasmide pMalc5x. La protéine recombinée a été exprimée et purifiée. Une expérience *pulldown* avec des billes magnétiques a été envisagée. Il serait intéressant d'avoir les résultats de cette expérience et de les comparer avec ceux trouvés par Bebel et al qui ont étudié le même système chez *H.*

pylori et avec Castillo et al. qui a mis en évidence l'interaction de cette protéine avec la recombinaise XerS (37,238).

De toute évidence, XerH est nécessaire pour une ségrégation chromosomique réussie dans cette bactérie (23,156). Il est intéressant de noter que *C. jejuni* (ainsi qu'*Helicobacter*, *Streptococcus* et *Lactococcus*) utilise une seule recombinaise Xer pour effectuer la résolution des dimères de chromosomes et assurer une ségrégation chromosomique fidèle, alors que les systèmes de recombinaison Xer de nombreuses autres bactéries nécessitent l'action combinée de deux recombinaises Xer, mais le mécanisme des systèmes Xer à une seule recombinaise n'est que partiellement compris. Par conséquent, la fonction essentielle et le mécanisme inhabituel de la recombinaison XerH/*difH* dans *C.jejuni* rendent XerH une cible de recherche intéressante qui pourrait permettre la conception de nouveaux agents antibactériens contre ce pathogène mortel.

Références bibliographiques

1. Jacob F, Wollman ÉL. Sexuality and the genetics of bacteria / François Jacob and Élie L. Wollman. 1 janv 1961;0-0.
2. Midonet C, Barre F-X. Xer Site-Specific Recombination: Promoting Vertical and Horizontal Transmission of Genetic Information. *Microbiol Spectr.* déc 2014;2(6).
3. Casjens S. The Diverse and Dynamic Structure of Bacterial Genomes. *Annual Review of Genetics.* 1998;32(1):339-77.
4. Feijoo-Siota L, Rama JLR, Sánchez-Pérez A, Villa TG. Considerations on bacterial nucleoids. *Appl Microbiol Biotechnol.* juill 2017;101(14):5591-602.
5. Val M-E, Soler-Bistué A, Bland MJ, Mazel D. Management of multipartite genomes: the *Vibrio cholerae* model. *Curr Opin Microbiol.* déc 2014;22:120-6.
6. Saier MH. The bacterial chromosome. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* avr 2008;43(2):89-134.
7. Ricke SC, Dawoud TM, Kim SA, Park SH, Kwon YM. Salmonella Cold Stress Response: Mechanisms and Occurrence in Foods. Chapter One. In: Gadd GM, Sariaslani S, éditeurs. *Advances in Applied Microbiology.* Academic Press; 2018. p. 1-38.
8. Messer W, Weigel C. DnaA initiator--also a transcription factor. *Mol Microbiol.* avr 1997;24(1):1-6.
9. Jha JK, Ramachandran R, Chattoraj DK. Opening the Strands of Replication Origins—Still an Open Question. *Front Mol Biosci.* 2016;0.
10. Sun B, Wang MD. Single-Molecule Optical-Trapping Techniques to Study Molecular Mechanisms of a Replisome. Chapter Three. In: Spies M, Chemla YR, éditeurs. *Methods in Enzymology.* Academic Press; 2017. p. 55-84. (Single-Molecule Enzymology: Nanomechanical Manipulation and Hybrid Methods; vol. 582).
11. Rocha EPC. The replication-related organization of bacterial genomes. *Microbiology (Reading).* juin 2004;150(Pt 6):1609-27.
12. Castillo F, Benmohamed A, Szatmari G. Xer Site Specific Recombination: Double and Single Recombinase Systems. *Front Microbiol.* 20 mars 2017;8.
13. Elshenawy MM, Jergic S, Xu Z-Q, Sobhy MA, Takahashi M, Oakley AJ, et al. Replisome speed determines the efficiency of the Tus-Ter replication termination barrier. *Nature.* 17 sept 2015;525(7569):394-8.

14. Gowrishankar J. End of the Beginning: Elongation and Termination Features of Alternative Modes of Chromosomal Replication Initiation in Bacteria. *PLOS Genetics*. 8 janv 2015;11(1):e1004909.
15. Pandey M, Elshenawy MM, Jergic S, Takahashi M, Dixon NE, Hamdan SM, et al. Two mechanisms coordinate replication termination by the *Escherichia coli* Tus–Ter complex. *Nucleic Acids Res*. 13 juill 2015;43(12):5924-35.
16. McClintock B. A Correlation of Ring-Shaped Chromosomes with Variegation in Zea Mays. *Proc Natl Acad Sci U S A*. déc 1932;18(12):677-81.
17. Adams DE, Shekhtman EM, Zechiedrich EL, Schmid MB, Cozzarelli NR. The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell*. 16 oct 1992;71(2):277-88.
18. Sherratt DJ, Arciszewska LK, Blakely G, Colloms S, Grant K, Leslie N, et al. Site-Specific Recombination and Circular Chromosome Segregation. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*. 1995;347(1319):37-42.
19. Hendricks EC, Szerlong H, Hill T, Kuempel P. Cell division, guillotining of dimer chromosomes and SOS induction in resolution mutants (*dif*, *xerC* and *xerD*) of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. mai 2000;36(4):973-81.
20. Pérals K, Cornet F, Merlet Y, Delon I, Louarn JM. 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*. avr 2000;36(1):33-43.
21. Steiner WW, Kuempel PL. Cell division is required for resolution of dimer chromosomes at the *dif* locus of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. janv 1998;27(2):257-68.
22. Argos P, Landy A, Abremski K, Egan JB, Haggard-Ljungquist E, Hoess RH, et al. The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *EMBO J*. févr 1986;5(2):433-40.
23. Carnoy C, Roten C-A. The *dif*/*Xer* recombination systems in proteobacteria. *PLoS One*. 3 sept 2009;4(9):e6531.
24. Badel C, Da Cunha V, Oberto J. Archaeal tyrosine recombinases. *FEMS Microbiology Reviews*. 1 févr 2021;fuab004.
25. Grindley NDF, Whiteson KL, Rice PA. Mechanisms of site-specific recombination. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:567-605.
26. Nunes-Düby SE, Kwon HJ, Tirumalai RS, Ellenberger T, Landy A. Similarities and differences among 105 members of the *Int* family of site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res*. 15 janv 1998;26(2):391-406.

27. Smith MCM, Thorpe HM. Diversity in the serine recombinases. *Molecular Microbiology*. 2002;44(2):299-307.
28. Stark WM, Sherratt DJ, Boocock MR. Site-specific recombination by Tn3 resolvase: topological changes in the forward and reverse reactions. *Cell*. 25 août 1989;58(4):779-90.
29. Brown WRA, Lee NCO, Xu Z, Smith MCM. Serine recombinases as tools for genome engineering. *Methods*. avr 2011;53(4):372-9.
30. Abremski KE, Hoess RH. Evidence for a second conserved arginine residue in the integrase family of recombination proteins. *Protein Eng*. janv 1992;5(1):87-91.
31. Esposito D, Scocca JJ. The integrase family of tyrosine recombinases: evolution of a conserved active site domain. *Nucleic Acids Res*. 15 sept 1997;25(18):3605-14.
32. Summers DK, Sherratt DJ. Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell*. avr 1984;36(4):1097-103.
33. Colloms SD, Sykora P, Szatmari G, Sherratt DJ. Recombination at ColE1 cer requires the *Escherichia coli* xerC gene product, a member of the lambda integrase family of site-specific recombinases. *J Bacteriol*. déc 1990;172(12):6973-80.
34. Blakely G, May G, McCulloch R, Arciszewska LK, Burke M, Lovett ST, et al. Two related recombinases are required for site-specific recombination at dif and cer in *E. coli* K12. *Cell*. 22 oct 1993;75(2):351-61.
35. Blakely G, Colloms S, May G, Burke M, Sherratt D. *Escherichia coli* XerC recombinase is required for chromosomal segregation at cell division. *New Biol*. août 1991;3(8):789-98.
36. Chalker AF, Lupas A, Ingraham K, So CY, Lunsford RD, Li T, et al. Genetic characterization of gram-positive homologs of the XerCD site-specific recombinases. *J Mol Microbiol Biotechnol*. avr 2000;2(2):225-33.
37. Bebel A, Karaca E, Kumar B, Stark WM, Barabas O. Structural snapshots of Xer recombination reveal activation by synaptic complex remodeling and DNA bending. *eLife*. 23 déc 2016;5:e19706.
38. Kono N, Arakawa K, Tomita M. Comprehensive prediction of chromosome dimer resolution sites in bacterial genomes. *BMC Genomics*. 11 janv 2011;12(1):19.
39. Recchia GD, Sherratt DJ. Conservation of xer site-specific recombination genes in bacteria. *Mol Microbiol*. déc 1999;34(5):1146-8.

40. Swalla BM, Gumpert RI, Gardner JF. Conservation of structure and function among tyrosine recombinases: homology-based modeling of the lambda integrase core-binding domain. *Nucleic Acids Res.* 1 févr 2003;31(3):805-18.
41. Biswas D, Hannon SJ. Genes coding for virulence determinants of *Campylobacter jejuni* in human clinical and cattle isolates from Alberta, Canada, and their potential role in colonization of poultry. *International Microbiology.* 2011;(14):25-32.
42. Chen Y, Narendra U, Iype LE, Cox MM, Rice PA. Crystal structure of a Flp recombinase-Holliday junction complex: assembly of an active oligomer by helix swapping. *Mol Cell.* oct 2000;6(4):885-97.
43. Gopaul DN, Duyn GD. Structure and mechanism in site-specific recombination. *Curr Opin Struct Biol.* févr 1999;9(1):14-20.
44. Hickman AB, Waninger S, Scocca JJ, Dyda F. Molecular organization in site-specific recombination: the catalytic domain of bacteriophage HP1 integrase at 2.7 Å resolution. *Cell.* 18 avr 1997;89(2):227-37.
45. Jo CH, Kim J, Han A, Park SY, Hwang KY, Nam KH. Crystal structure of *Thermoplasma acidophilum* XerA recombinase shows large C-shape clamp conformation and cis-cleavage mode for nucleophilic tyrosine. *FEBS Letters.* 2016;590(6):848-56.
46. Kwon HJ, Tirumalai R, Landy A, Ellenberger T. Flexibility in DNA recombination: structure of the lambda integrase catalytic core. *Science.* 4 avr 1997;276(5309):126-31.
47. Martin SS, Pulido E, Chu VC, Lechner TS, Baldwin EP. 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.* 24 mai 2002;319(1):107-27.
48. Meinke G, Bohm A, Hauber J, Pisabarro MT, Buchholz F. Cre Recombinase and Other Tyrosine Recombinases. *Chem Rev.* 26 oct 2016;116(20):12785-820.
49. Subramanya HS, Arciszewska LK, Baker RA, Bird LE, Sherratt DJ, Wigley DB. Crystal structure of the site-specific recombinase, XerD. *EMBO J.* 1 sept 1997;16(17):5178-87.
50. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* juill 1987;4(4):406-25.
51. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* août 2007;24(8):1596-9.
52. Kuempel PL, Henson JM, Dircks L, Tecklenburg M, Lim DF. dif, a recA-independent recombination site in the terminus region of the chromosome of *Escherichia coli*. *New Biol.* août 1991;3(8):799-811.

53. Rajeev L, Malanowska K, Gardner JF. Challenging a Paradigm: the Role of DNA Homology in Tyrosine Recombinase Reactions. *Microbiol Mol Biol Rev.* juin 2009;73(2):300-9.
54. Aussel L, Barre FX, Aroyo M, Stasiak A, Stasiak AZ, Sherratt D. FtsK Is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell.* 25 janv 2002;108(2):195-205.
55. Hallet B, Arciszewska LK, Sherratt DJ. Reciprocal control of catalysis by the tyrosine recombinases XerC and XerD: an enzymatic switch in site-specific recombination. *Mol Cell.* déc 1999;4(6):949-59.
56. Vanhooff V, Normand C, Galloy C, Segall AM, Hallet B. Control of directionality in the DNA strand-exchange reaction catalysed by the tyrosine recombinase TnpI. *Nucleic Acids Res.* avr 2010;38(6):2044-56.
57. Diagne CT, Salhi M, Crozat E, Salomé L, Cornet F, Rousseau P, et al. TPM analyses reveal that FtsK contributes both to the assembly and the activation of the XerCD-dif recombination synapse. *Nucleic Acids Res.* févr 2014;42(3):1721-32.
58. Zawadzki P, May PFJ, Baker RA, Pinkney JNM, Kapanidis AN, Sherratt DJ, et al. Conformational transitions during FtsK translocase activation of individual XerCD-dif recombination complexes. *PNAS.* 22 oct 2013;110(43):17302-7.
59. Gitai Z, Thanbichler M, Shapiro L. The choreographed dynamics of bacterial chromosomes. *Trends Microbiol.* mai 2005;13(5):221-8.
60. Reyes-Lamothe R, Wang X, Sherratt D. *Escherichia coli* and its chromosome. *Trends Microbiol.* mai 2008;16(5):238-45.
61. Reyes-Lamothe R, Nicolas E, Sherratt DJ. Chromosome replication and segregation in bacteria. *Annu Rev Genet.* 2012;46:121-43.
62. Sherratt DJ. Bacterial chromosome dynamics. *Science.* 8 août 2003;301(5634):780-5.
63. Kaimer C, Graumann PL. Players between the worlds: multifunctional DNA translocases. *Curr Opin Microbiol.* déc 2011;14(6):719-25.
64. Barre F-X. FtsK and SpoIIIE: the tale of the conserved tails. *Molecular Microbiology.* 2007;66(5):1051-5.
65. Saleh OA, Péral C, Barre F-X, Allemand J-F. Fast, DNA-sequence independent translocation by FtsK in a single-molecule experiment. *The EMBO journal.* 2004;23(12):2430-9.
66. Besprozvannaya M, Burton BM. Do the same traffic rules apply? Directional chromosome segregation by SpoIIIE and FtsK. *Mol Microbiol.* août 2014;93(4):599-608.

67. Bisicchia P, Steel B, Mariam Debela MH, Löwe J, Sherratt D. The N-terminal membrane-spanning domain of the *Escherichia coli* DNA translocase FtsK hexamerizes at midcell. *mBio*. 3 déc 2013;4(6):e00800-00813.
68. Graham JE, Sivanathan V, Sherratt DJ, Arciszewska LK. FtsK translocation on DNA stops at XerCD-dif. *Nucleic Acids Res*. janv 2010;38(1):72-81.
69. Grainge I, Lesterlin C, Sherratt DJ. Activation of XerCD-*dif* recombination by the FtsK DNA translocase. *Nucleic Acids Res*. juill 2011;39(12):5140-8.
70. Löwe J, Ellonen A, Allen MD, Atkinson C, Sherratt DJ, Grainge I. Molecular mechanism of sequence-directed DNA loading and translocation by FtsK. *Mol Cell*. 22 août 2008;31(4):498-509.
71. Nolivos S, Touzain F, Pages C, Coddeville M, Rousseau P, El Karoui M, et al. Co-evolution of segregation guide DNA motifs and the FtsK translocase in bacteria: identification of the atypical *Lactococcus lactis* KOPS motif. *Nucleic Acids Res*. juill 2012;40(12):5535-45.
72. Bebel A. Mechanistic insights into Xer recombination and conjugative transposition in *Helicobacter pylori*. 2015.
73. Begg KJ, Dewar SJ, Donachie WD. A new *Escherichia coli* cell division gene, ftsK. *J Bacteriol*. nov 1995;177(21):6211-22.
74. Yu XC, Tran AH, Sun Q, Margolin W. Localization of cell division protein FtsK to the *Escherichia coli* septum and identification of a potential N-terminal targeting domain. *J Bacteriol*. mars 1998;180(5):1296-304.
75. Steiner W, Liu G, Donachie WD, Kuempel P. The cytoplasmic domain of FtsK protein is required for resolution of chromosome dimers. *Molecular Microbiology*. 1999;31(2):579-83.
76. Bigot S, Sivanathan V, Possoz C, Barre F-X, Cornet F. FtsK, a literate chromosome segregation machine. *Molecular Microbiology*. 2007;64(6):1434-41.
77. Bath J, Wu LJ, Errington J, Wang JC. Role of *Bacillus subtilis* SpoIIIE in DNA transport across the mother cell-prespore division septum. *Science*. 3 nov 2000;290(5493):995-7.
78. Kaimer C, González-Pastor JE, Graumann PL. SpoIIIE and a novel type of DNA translocase, SftA, couple chromosome segregation with cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. nov 2009;74(4):810-25.
79. Massey TH, Mercogliano CP, Yates J, Sherratt DJ, Löwe J. Double-Stranded DNA Translocation: Structure and Mechanism of Hexameric FtsK. *Molecular Cell*. 18 août 2006;23(4):457-69.

80. Berezuk AM, Goodyear M, Khursigara CM. Site-directed fluorescence labeling reveals a revised N-terminal membrane topology and functional periplasmic residues in the *Escherichia coli* cell division protein FtsK. *J Biol Chem.* 22 août 2014;289(34):23287-301.
81. Dorazi R, Dewar SJ. The SOS promoter *dinH* is essential for *ftsK* transcription during cell division. *Microbiology (Reading).* nov 2000;146 (Pt 11):2891-9.
82. Draper GC, McLennan N, Begg K, Masters M, Donachie WD. Only the N-terminal domain of FtsK functions in cell division. *J Bacteriol.* sept 1998;180(17):4621-7.
83. Wang L, Lutkenhaus J. FtsK is an essential cell division protein that is localized to the septum and induced as part of the SOS response. *Mol Microbiol.* août 1998;29(3):731-40.
84. Dubarry N, Possoz C, Barre F-X. Multiple regions along the *Escherichia coli* FtsK protein are implicated in cell division. *Mol Microbiol.* déc 2010;78(5):1088-100.
85. Val M-E, Kennedy SP, Karoui ME, Bonné L, Chevalier F, Barre F-X. FtsK-Dependent Dimer Resolution on Multiple Chromosomes in the Pathogen *Vibrio cholerae*. *PLOS Genetics.* 26 sept 2008;4(9):e1000201.
86. Bigot S, Corre J, Louarn J-M, Cornet F, Barre F-X. FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein. *Molecular Microbiology.* 2004;54(4):876-86.
87. Liu G, Draper GC, Donachie WD. FtsK is a bifunctional protein involved in cell division and chromosome localization in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* août 1998;29(3):893-903.
88. Yu XC, Weihe EK, Margolin W. Role of the C terminus of FtsK in *Escherichia coli* chromosome segregation. *J Bacteriol.* déc 1998;180(23):6424-8.
89. Barre F-X, Aroyo M, Colloms SD, Helfrich A, Cornet F, Sherratt DJ. FtsK functions in the processing of a Holliday junction intermediate during bacterial chromosome segregation. *Genes Dev.* 1 déc 2000;14(23):2976-88.
90. Yates J, Aroyo M, Sherratt DJ, Barre F-X. Species specificity in the activation of Xer recombination at *dif* by FtsK. *Mol Microbiol.* juill 2003;49(1):241-9.
91. Sciochetti SA, Piggot PJ, Blakely GW. Identification and Characterization of the *dif* Site from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* févr 2001;183(3):1058-68.
92. Levy O, Ptacin JL, Pease PJ, Gore J, Eisen MB, Bustamante C, et al. Identification of oligonucleotide sequences that direct the movement of the *Escherichia coli* FtsK translocase. *PNAS.* 6 déc 2005;102(49):17618-23.

93. Sivanathan V, Emerson JE, Pages C, Cornet F, Sherratt DJ, Arciszewska LK. KOPS-guided DNA translocation by FtsK safeguards *Escherichia coli* chromosome segregation. *Molecular Microbiology*. 2009;71(4):1031-42.
94. Lee JY, Finkelstein IJ, Crozat E, Sherratt DJ, Greene EC. Single-molecule imaging of DNA curtains reveals mechanisms of KOPS sequence targeting by the DNA translocase FtsK. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24 avr 2012;109(17):6531-6.
95. Pease PJ, Levy O, Cost GJ, Gore J, Ptacin JL, Sherratt D, et al. Sequence-Directed DNA Translocation by Purified FtsK. *Science*. 28 janv 2005;307(5709):586-90.
96. Saleh OA, Bigot S, Barre F-X, Allemand J-F. Analysis of DNA supercoil induction by FtsK indicates translocation without groove-tracking. *Nat Struct Mol Biol*. 1 mai 2005;12(5):436-40.
97. May PFJ, Zawadzki P, Sherratt DJ, Kapanidis AN, Arciszewska LK. Assembly, translocation, and activation of XerCD-*dif* recombination by FtsK translocase analyzed in real-time by FRET and two-color tethered fluorophore motion. *PNAS*. 15 sept 2015;112(37):E5133-41.
98. Field CM, Summers DK. Multicopy plasmid stability: revisiting the dimer catastrophe. *J Theor Biol*. 21 déc 2011;291:119-27.
99. Summers DK, Beton CW, Withers HL. Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis. *Mol Microbiol*. juin 1993;8(6):1031-8.
100. Million-Weaver S, Camps M. Mechanisms of plasmid segregation: have multicopy plasmids been overlooked? *Plasmid*. sept 2014;75:27-36.
101. Austin S, Ziese M, Sternberg N. A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell*. sept 1981;25(3):729-36.
102. Warth L, Haug I, Altenbuchner J. Characterization of the tyrosine recombinase MrpA encoded by the *Streptomyces coelicolor* A3(2) plasmid SCP2*. *Arch Microbiol*. mars 2011;193(3):187-200.
103. Crozat E, Fournes F, Cornet F, Hallet B, Rousseau P. Resolution of Multimeric Forms of Circular Plasmids and Chromosomes. *Microbiol Spectr*. oct 2014;2(5).
104. Sengupta M, Austin S. Prevalence and Significance of Plasmid Maintenance Functions in the Virulence Plasmids of Pathogenic Bacteria ∇ . *Infect Immun*. juill 2011;79(7):2502-9.
105. Cornet F, Mortier I, Patte J, Louarn JM. 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*. juin 1994;176(11):3188-95.

106. Colloms SD, McCulloch R, Grant K, Neilson L, Sherratt DJ. Xer-mediated site-specific recombination *in vitro*. EMBO J. 1 mars 1996;15(5):1172-81.
107. Colloms SD, Alén C, Sherratt DJ. The ArcA/ArcB two-component regulatory system of *Escherichia coli* is essential for Xer site-specific recombination at psi. Mol Microbiol. mai 1998;28(3):521-30.
108. Maas WK. The arginine repressor of *Escherichia coli*. Microbiol Rev. déc 1994;58(4):631-40.
109. Stirling CJ, Stewart G, Sherratt DJ. Multicopy plasmid stability in *Escherichia coli* requires host-encoded functions that lead to plasmid site-specific recombination. Mol Gen Genet. 1 sept 1988;214(1):80-4.
110. Stirling CJ, Szatmari G, Stewart G, Smith MC, Sherratt DJ. The arginine repressor is essential for plasmid-stabilizing site-specific recombination at the ColE1 cer locus. EMBO J. 20 déc 1988;7(13):4389-95.
111. Stirling CJ, Colloms SD, Collins JF, Szatmari G, Sherratt DJ. xerB, an *Escherichia coli* gene required for plasmid ColE1 site-specific recombination, is identical to pepA, encoding aminopeptidase A, a protein with substantial similarity to bovine lens leucine aminopeptidase. EMBO J. mai 1989;8(5):1623-7.
112. Reijns M, Lu Y, Leach S, Colloms SD. Mutagenesis of PepA suggests a new model for the Xer/cer synaptic complex. Mol Microbiol. août 2005;57(4):927-41.
113. Sénéchal H, Delesques J, Szatmari G. *Escherichia coli* ArgR mutants defective in cer/Xer recombination, but not in DNA binding. FEMS Microbiol Lett. avr 2010;305(2):162-9.
114. Bath J, Sherratt DJ, Colloms SD. Topology of Xer recombination on catenanes produced by lambda integrase. J Mol Biol. 18 juin 1999;289(4):873-83.
115. Colloms SD, Bath J, Sherratt DJ. Topological selectivity in Xer site-specific recombination. Cell. 21 mars 1997;88(6):855-64.
116. Bregu M, Sherratt DJ, Colloms SD. Accessory factors determine the order of strand exchange in Xer recombination at psi. EMBO J. 15 juill 2002;21(14):3888-97.
117. Blake JAR, Ganguly N, Sherratt DJ. DNA sequence of recombinase-binding sites can determine Xer site-specific recombination outcome. Molecular Microbiology. 1997;23(2):387-98.
118. Loot C, Ducos-Galand M, Escudero JA, Bouvier M, Mazel D. Replicative resolution of integron cassette insertion. Nucleic Acids Res. sept 2012;40(17):8361-70.

119. McCulloch R, Coggins LW, Colloms SD, Sherratt DJ. Xer-mediated site-specific recombination at *cer* generates Holliday junctions in vivo. *EMBO J.* 15 avr 1994;13(8):1844-55.
120. Dillard JP, Seifert HS. A variable genetic island specific for *Neisseria gonorrhoeae* is involved in providing DNA for natural transformation and is found more often in disseminated infection isolates. *Molecular Microbiology.* 2001;41(1):263-77.
121. Hassan F, Kamruzzaman M, Mekalanos JJ, Faruque SM. Satellite phage TLC ϕ enables toxigenic conversion by CTX phage through *dif* site alteration. *Nature.* oct 2010;467(7318):982-5.
122. Huber KE, Waldor MK. Filamentous phage integration requires the host recombinases XerC and XerD. *Nature.* 6 juin 2002;417(6889):656-9.
123. Das B, Martínez E, Midonet C, Barre F-X. Integrative mobile elements exploiting Xer recombination. *Trends Microbiol.* janv 2013;21(1):23-30.
124. Dai H, Chow TY, Liao HJ, Chen ZY, Chiang KS. Nucleotide sequences involved in the neolysogenic insertion of filamentous phage Cf16-v1 into the *Xanthomonas campestris* pv. *citri* chromosome. *Virology.* déc 1988;167(2):613-20.
125. Das B, Bischerour J, Barre F-X. Molecular mechanism of acquisition of the cholera toxin genes. *Indian J Med Res.* févr 2011;133(2):195-200.
126. Derbise A, Chenal-Francisque V, Pouillot F, Fayolle C, Prévost M-C, Médigue C, et al. A horizontally acquired filamentous phage contributes to the pathogenicity of the plague *bacillus*. *Molecular Microbiology.* 2007;63(4):1145-57.
127. Gonzalez MD, Lichtensteiger CA, Caughlan R, Vimr ER. Conserved Filamentous Prophage in *Escherichia coli* O18:K1:H7 and *Yersinia pestis* Biovar orientalis. *J Bacteriol.* nov 2002;184(21):6050-5.
128. Simpson AJ, Reinach FC, Arruda P, Abreu FA, Acencio M, Alvarenga R, et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. *Nature.* 13 juill 2000;406(6792):151-9.
129. Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science.* 28 juin 1996;272(5270):1910-4.
130. Bischerour J, Spangenberg C, Barre F-X. Holliday junction affinity of the base excision repair factor Endo III contributes to cholera toxin phage integration. *EMBO J.* 12 sept 2012;31(18):3757-67.

131. Val M-E, Bouvier M, Campos J, Sherratt D, Cornet F, Mazel D, et al. The single-stranded genome of phage CTX is the form used for integration into the genome of *Vibrio cholerae*. *Mol Cell*. 19 août 2005;19(4):559-66.
132. McLeod SM, Waldor MK. Characterization of XerC- and XerD-dependent CTX phage integration in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*. nov 2004;54(4):935-47.
133. Das B. Mechanistic insights into filamentous phage integration in *Vibrio cholerae*. *Front Microbiol*. 28 nov 2014;5:650.
134. Faruque SM, Mekalanos JJ. Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Virulence*. 15 nov 2012;3(7):556-65.
135. Campos J, Martínez E, Suzarte E, Rodríguez BL, Marrero K, Silva Y, et al. VGJ phi, a novel filamentous phage of *Vibrio cholerae*, integrates into the same chromosomal site as CTX phi. *J Bacteriol*. oct 2003;185(19):5685-96.
136. Rubin EJ, Lin W, Mekalanos JJ, Waldor MK. Replication and integration of a *Vibrio cholerae* cryptic plasmid linked to the CTX prophage. *Mol Microbiol*. juin 1998;28(6):1247-54.
137. Midonet C, Miele S, Paly E, Guerois R, Barre F-X. The TLCΦ satellite phage harbors a Xer recombination activation factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 16 août 2019;201902905.
138. Midonet C, Barre F-X. How Xer-exploiting mobile elements overcome cellular control. *PNAS*. 26 juill 2016;113(30):8343-5.
139. D'Andrea MM, Giani T, D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Visca P, et al. Characterization of pABVA01, a plasmid encoding the OXA-24 carbapenemase from Italian isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. août 2009;53(8):3528-33.
140. Grosso F, Quinteira S, Poirel L, Novais Â, Peixe L. Role of common blaOXA-24/OXA-40-carrying platforms and plasmids in the spread of OXA-24/OXA-40 among *Acinetobacter* species clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. juill 2012;56(7):3969-72.
141. Merino M, Acosta J, Poza M, Sanz F, Beceiro A, Chaves F, et al. OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. *Antimicrob Agents Chemother*. juin 2010;54(6):2724-7.
142. Balalovski P, Grainge I. Mobilization of pdif modules in *Acinetobacter*: A novel mechanism for antibiotic resistance gene shuffling? *Molecular Microbiology*. 2020;114(5):699-709.
143. Povilonis J, Seputiene V, Krasauskas R, Juskaite R, Miskinyte M, Suziedelis K, et al. Spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying a plasmid with two genes encoding OXA-72 carbapenemase in Lithuanian hospitals. *J Antimicrob Chemother*. mai 2013;68(5):1000-6.

144. Blackwell GA, Hall RM. The tet39 Determinant and the msrE-mphE Genes in *Acinetobacter* Plasmids Are Each Part of Discrete Modules Flanked by Inversely Oriented pdif (XerC-XerD) Sites. *Antimicrob Agents Chemother.* août 2017;61(8):e00780-17.
145. Antonelli A, D'Andrea MM, Di Pilato V, Viaggi B, Torricelli F, Rossolini GM. Characterization of a Novel Putative Xer-Dependent Integrative Mobile Element Carrying the blaNMC-A Carbapenemase Gene, Inserted into the Chromosome of Members of the *Enterobacter cloacae* Complex. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2015;59(10):6620-4.
146. Davin-Regli A, Pagès J-M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol.* 2015;6:392.
147. Boyd DA, Mataseje LF, Davidson R, Delpont JA, Fuller J, Hoang L, et al. *Enterobacter cloacae* Complex Isolates Harboring blaNMC-A or blaIMI-Type Class A Carbapenemase Genes on Novel Chromosomal Integrative Elements and Plasmids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 61(5):e02578-16.
148. Wu H, Zhang Z, Hu S, Yu J. On the molecular mechanism of GC content variation among eubacterial genomes. *Biology Direct.* 10 janv 2012;7(1):2.
149. Le Bourgeois P, Bugarel M, Campo N, Daveran-Mingot M-L, Labonté J, Lanfranchi D, et al. The unconventional Xer recombination machinery of *Streptococci/Lactococci*. *PLoS Genet.* juill 2007;3(7):e117.
150. Cortez D, Quevillon-Cheruel S, Gribaldo S, Desnoues N, Sezonov G, Forterre P, et al. Evidence for a Xer/dif System for Chromosome Resolution in Archaea. Burkholder WF, éditeur. *PLoS Genet.* 21 oct 2010;6(10):e1001166.
151. Duggin IG, Dubarry N, Bell SD. Replication termination and chromosome dimer resolution in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *EMBO J.* 5 janv 2011;30(1):145-53.
152. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* déc 2013;30(12):2725-9.
153. Leroux M, Jia F, Szatmari G. Characterization of the *Streptococcus suis* XerS recombinase and its unconventional cleavage of the difSL site. *FEMS Microbiol Lett.* nov 2011;324(2):135-41.
154. Nolivos S, Pages C, Rousseau P, Le Bourgeois P, Cornet F. Are two better than one? Analysis of an FtsK/Xer recombination system that uses a single recombinase. *Nucleic Acids Res.* oct 2010;38(19):6477-89.
155. Debowski AW, Carnoy C, Verbrugghe P, Nilsson H-O, Gauntlett JC, Fulurija A, et al. Xer Recombinase and Genome Integrity in *Helicobacter pylori*, a Pathogen without Topoisomerase IV. Ahmed N, éditeur. *PLoS ONE.* 12 avr 2012;7(4):e33310.

156. Leroux M, Rezoug Z, Szatmari G. The Xer/dif site-specific recombination system of *Campylobacter jejuni*. *Mol Genet Genomics*. oct 2013;288(10):495-502.
157. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 1 nov 2007;23(21):2947-8.
158. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. 1 mai 2009;25(9):1189-91.
159. Haldenby S, White MF, Allers T. RecA family proteins in archaea: RadA and its cousins. *Biochem Soc Trans*. févr 2009;37(Pt 1):102-7.
160. Serre M-C, Arnaout TE, Brooks MA, Durand D, Lisboa J, Lazar N, et al. The Carboxy-Terminal α N Helix of the Archaeal XerA Tyrosine Recombinase Is a Molecular Switch to Control Site-Specific Recombination. *PLOS ONE*. 7 mai 2013;8(5):e63010.
161. Serre M-C, Duguet M. Enzymes that cleave and religate DNA at high temperature: the same story with different actors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2003;74:37-81.
162. Iyer LM, Makarova KS, Koonin EV, Aravind L. Comparative genomics of the FtsK-HerA superfamily of pumping ATPases: implications for the origins of chromosome segregation, cell division and viral capsid packaging. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(17):5260-79.
163. Butzler J-P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clinical Microbiology and Infection*. oct 2004;10(10):868-76.
164. McFadyean J, Stockman S, Great Britain, Board of Agriculture and Fisheries, Committee to Inquire into Epizootic Abortion. Report of the Departmental Committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion. Appendix to part III, Abortion in sheep. London [England: Printed under the authority of H.M.S.O. by Eyre and Spottiswoode; 1913.
165. Smith T, Taylor MS. SOME morphological and biological characters of the spirilla (*Vibrio fetus*, n. Sp.) Associated with disease of the fetal membranes in cattle. *J exp med*. 1 oct 1919;30(4):299-311.
166. Jones FS, Orcutt M, Little RB. *Vibriosis (Vibrio jejuni, n.sp.)* Associated with intestinal disorders of cows and calves. *J exp med*. 31 mai 1931;53(6):853-63.
167. Doyle LP. A vibrio associated with swine dysentery. *Am J Vet Res*. 1944;5(3):3-5.
168. Levy AJ. A gastro-enteritis outbreak probably due to a bovine strain of vibrio. *The Yale journal of biology and medicine*. 1946;18(4):243.

169. Acheson D, Allos BM. *Campylobacter jejuni* Infections: Update on Emerging Issues and Trends. *Clinical Infectious Diseases*. 15 avr 2001;32(8):1201-6.
170. Silva J, Leite D, Fernandes M, Mena C, Gibbs PA, Teixeira P. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Front Microbiol*. 2011; 2: 200. 2011.
171. Dekeyser P, Gossuin-Detrain M, Butzler J-P, Sternon J. Acute enteritis due to related *vibrio*: first positive stool cultures. *Journal of Infectious Diseases*. 1972;125(4):390-2.
172. Murray PR, Baron EJ. *Manual of clinical microbiology*. Washington, D.C.: ASM Press; 2007.
173. Skirrow MB. *Campylobacter enteritis*: a "new" disease. *Br Med J*. 1977;2(6078):9-11.
174. Ngulukun S. Taxonomy and physiological characteristics of *Campylobacter* spp. In: *Campylobacter: Features, Detection, and Prevention of Foodborne Disease*. 2017. p. 41-60.
175. Véron M, Chatelain R. Taxonomic Study of the Genus *Campylobacter* Sebald and Véron and Designation of the Neotype Strain for the Type Species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1973;23(2):122-34.
176. Vandamme P, De Ley J. Proposal for a New Family, *Campylobacteraceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1 juill 1991;41(3):451-5.
177. Ammar AM, El-Naenaeey E-SY, El-Hamid MIA, El-Gedawy AA, Elmalt RMS. *Campylobacter* as a major foodborne pathogen: a review of its characteristics, pathogenesis, antimicrobial resistance and control. *J microb biotech food sci*. 1 févr 2021;10(4):609-19.
178. Parte AC. LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucl Acids Res*. janv 2014;42(D1):D613-6.
179. Vandamme P. Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*. In: *Campylobacter*. ASM Press; 2000. p. 3-26.
180. Debruyne L, Gevers D, Vandamme P. Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*. In: *Campylobacter*. ASM Press; 2008. p. 3-25.
181. Mangels JI. *Campylobacter jejuni*: Foodborne Gastroenteritis: 21DL-994 (3.0 CEU). California Association for Medical Laboratory Technology. 2014.
182. Ikeda N, Karlyshev AV. Putative mechanisms and biological role of coccoid form formation in *Campylobacter jejuni*. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. mars 2012;2(1):41-9.
183. Shigematsu M, Umeda A, Fujimoto S, Amako K. Spirochaete-like swimming mode of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment. *J Med Microbiol*. juin 1998;47(6):521-6.

184. Bhunia AK. *Campylobacter* and *Arcobacter*. In: Bhunia AK, éditeur. Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis. New York, NY: Springer; 2018. p. 289-99. (Food Science Text Series).
185. Goni MD, Muhammad IJ, Goje M, Goni M, Bitrus AA, Abbas MA. *Campylobacter* in Dogs and Cats; Its detection and Public Health Significance: A Review. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 2017;10.
186. Gallay A, Prouzet-Mauléon V, Kempf I, Lehours P, Labadi L, Camou C, et al. *Campylobacter* Antimicrobial Drug Resistance among Humans, Broiler Chickens, and Pigs, France. *Emerg Infect Dis*. févr 2007;13(2):259-66.
187. Jesse TW, Englen MD, Pittenger-Alley LG, Fedorka-Cray PJ. Two distinct mutations in *gyrA* lead to ciprofloxacin and nalidixic acid resistance in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from chickens and beef cattle*. *Journal of Applied Microbiology*. 2006;100(4):682-8.
188. Llarena A-K. Population genetics and molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni*. 14 déc 2015;
189. Bester LA, Phulukdaree A, Khan N, Essack SY. Efficacy of phenotypic, PCR and MALDI -ToF identification methods for *Campylobacter* spp. juin 2016;
190. Solomon EB, Hoover DG. *Campylobacter jejuni*: a bacterial paradox. *Journal of food safety*. 1 août 1999;19(2):121-36.
191. Murphy C, Carroll C, Jordan KN. Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *J Appl Microbiol*. avr 2006;100(4):623-32.
192. Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*. févr 2000;403(6770):665-8.
193. Cody AJ, Maiden MC, Strachan NJ, McCarthy ND. A systematic review of source attribution of human campylobacteriosis using multilocus sequence typing. *Eurosurveillance*. 24 oct 2019;24(43):1800696.
194. Zbrun MV, Rossler E, Soto LP, Rosmini MR, Sequeira GJ, Frizzo LS, et al. Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolates from the broiler production chain: first report of MLST profiles in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 1 janv 2021;53(1):59-63.
195. EFSA, ECDC. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal*. 2021;19(2):e06406.

196. Epps SVR, Harvey RB, Hume ME, Phillips TD, Anderson RC, Nisbet DJ. Foodborne *Campylobacter*: Infections, Metabolism, Pathogenesis and Reservoirs. *Int J Environ Res Public Health*. déc 2013;10(12):6292-304.
197. Fischer GH, Paterek E. *Campylobacter*. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
198. Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clin Microbiol Rev*. juill 2015;28(3):687-720.
199. Agence de la santé publique du Canada. Surveillance of campylobacteriosis (*Campylobacter*). 2018.
200. Alberta Government. Notifiable diseases in Alberta annual report. Alberta Health and Wellness Edmonton, AB, Canada; 2004.
201. Inglis GD, Boras VF, Houde A. *Enteric campylobacteria* and RNA viruses associated with healthy and diarrheic humans in the Chinook health region of southwestern Alberta, Canada. *J Clin Microbiol*. janv 2011;49(1):209-19.
202. Inglis GD, Gusse JF, House KE, Shelton TG, Taboada EN. Clinically Relevant *Campylobacter jejuni* Subtypes Are Readily Found and Transmitted within the Cattle Production Continuum but Present a Limited Foodborne Risk. *Appl Environ Microbiol*. 2 mars 2020;86(6):e02101-19.
203. Arsenault J, Berke O, Michel P, Ravel A, Gosselin P. Environmental and demographic risk factors for campylobacteriosis: do various geographical scales tell the same story? *BMC Infect Dis*. 22 nov 2012;12:318.
204. MSSS. Vigie et surveillance des maladies à déclaration obligatoire d'origine infectieuse - Rapport annuel 2017 - Publications du ministère de la Santé et des Services sociaux. 2018.
205. MSSS. Campylobactériose - Professionnels de la santé - MSSS. 2018a.
206. Amour C, Gratz J, Mduma E, Svensen E, Rogawski ET, McGrath M, et al. Epidemiology and Impact of *Campylobacter* Infection in Children in 8 Low-Resource Settings: Results From the MAL-ED Study. *Clin Infect Dis*. 7 août 2016;ciw542.
207. Heredia N, Wesley I, García S. Microbiologically Safe Foods. In: *Microbiologically Safe Foods*. John Wiley & Sons, Ltd; 2009. p. i-xxviii.
208. Gras LM, Smid JH, Wagenaar JA, Boer AG de, Havelaar AH, Friesema IHM, et al. Risk Factors for Campylobacteriosis of Chicken, Ruminant, and Environmental Origin: A Combined Case-Control and Source Attribution Analysis. *PLOS ONE*. 3 août 2012;7(8):e42599.

209. Iglesias-Torrens Y, Miró E, Guirado P, Llovet T, Muñoz C, Cerdà-Cuéllar M, et al. Population Structure, Antimicrobial Resistance, and Virulence-Associated Genes in *Campylobacter jejuni* Isolated From Three Ecological Niches: Gastroenteritis Patients, Broilers, and Wild Birds. *Front Microbiol.* 2018;9.
210. Lévesque S, Fournier E, Carrier N, Frost E, Arbeit RD, Michaud S. Campylobacteriosis in Urban versus Rural Areas: A Case-Case Study Integrated with Molecular Typing to Validate Risk Factors and to Attribute Sources of Infection. Chang Y-F, éditeur. *PLoS ONE.* 26 déc 2013;8(12):e83731.
211. Humphrey T, O'Brien S, Madsen M. Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int J Food Microbiol.* 15 juill 2007;117(3):237-57.
212. Berthenet E, Thépault A, Chemaly M, Rivoal K, Ducournau A, Buissonnière A, et al. Source attribution of *Campylobacter jejuni* shows variable importance of chicken and ruminants reservoirs in non-invasive and invasive French clinical isolates. *Sci Rep.* 30 mai 2019;9(1):8098.
213. Sheppard SK, Dallas JF, Strachan NJC, MacRae M, McCarthy ND, Wilson DJ, et al. *Campylobacter* Genotyping to Determine the Source of Human Infection. *CLIN INFECT DIS.* 15 avr 2009;48(8):1072-8.
214. Vogt N, Pearl D, Taboada E, Mutschall S, Bondo K, Jardine C. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* in raccoons (*Procyon lotor*) on swine farms and in conservation areas in southern Ontario. *Zoonoses and Public Health.* 26 nov 2020;68.
215. Silva W, Targino B, Gonçalves A, Silva M, Hungaro H. *Campylobacter* : An Important Food Safety Issue. In: *Food Safety and Preservation.* 2018. p. 391-430.
216. Galate DL, Bangde SR. *Campylobacter – A Foodborne Pathogen.* 2015.
217. Bolton DJ. *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiology.* 1 juin 2015;48:99-108.
218. García-Sánchez L, Melero B, Jaime I, Hänninen M-L, Rossi M, Rovira J. *Campylobacter jejuni* survival in a poultry processing plant environment. *Food Microbiology.* 1 août 2017;65:185-92.
219. Lai C-K, Chen Y-A, Lin C-J, Lin H-J, Kao M-C, Huang M-Z, et al. Molecular Mechanisms and Potential Clinical Applications of *Campylobacter jejuni* Cytolethal Distending Toxin. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6.
220. Zhang T, Luo Q, Chen Y, Li T, Wen G, Zhang R, et al. Molecular epidemiology, virulence determinants and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spreading in retail chicken meat in Central China. *Gut Pathogens.* 26 oct 2016;8(1):48.

221. Robinson DA. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. Br Med J (Clin Res Ed). 16 mai 1981;282(6276):1584.
222. Backert S, Tegtmeyer N, Cróinín TO, Boehm M, Heimesaat M. Chapter 1 – Human campylobacteriosis. In 2017.
223. Heimesaat MM, Backert S, Alter T, Bereswill S. Human Campylobacteriosis—A Serious Infectious Threat in a One Health Perspective. Fighting *Campylobacter* Infections. 24 févr 2021;431:1-23.
224. Wakerley BR, Uncini A, Yuki N, GBS Classification Group, GBS Classification Group. Guillain-Barré and Miller Fisher syndromes--new diagnostic classification. Nat Rev Neurol. sept 2014;10(9):537-44.
225. Gundogdu O, Bentley SD, Holden MT, Parkhill J, Dorrell N, Wren BW. Re-annotation and re-analysis of the *Campylobacter jejuni* NCTC11168 genome sequence. BMC Genomics. 12 juin 2007;8(1):162.
226. Fouts DE, Mongodin EF, Mandrell RE, Miller WG, Rasko DA, Ravel J, et al. Major Structural Differences and Novel Potential Virulence Mechanisms from the Genomes of Multiple *Campylobacter* Species. Relman DA, éditeur. PLoS Biol. 4 janv 2005;3(1):e15.
227. Hofreuter D, Tsai J, Watson RO, Novik V, Altman B, Benitez M, et al. Unique Features of a Highly Pathogenic *Campylobacter jejuni* Strain. Infect Immun. août 2006;74(8):4694-707.
228. Pearson BM, Gaskin DJH, Segers RPAM, Wells JM, Nuijten PJM, van Vliet AHM. The Complete Genome Sequence of *Campylobacter jejuni* Strain 81116 (NCTC11828). J Bacteriol. nov 2007;189(22):8402-3.
229. Young KT, Davis LM, Dirita VJ. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. Nat Rev Microbiol. sept 2007;5(9):665-79.
230. Parker CT, Quiñones B, Miller WG, Horn ST, Mandrell RE. Comparative genomic analysis of *Campylobacter jejuni* strains reveals diversity due to genomic elements similar to those present in C. jejuni strain RM1221. J Clin Microbiol. nov 2006;44(11):4125-35.
231. Bacon DJ, Alm RA, Hu L, Hickey TE, Ewing CP, Batchelor RA, et al. DNA Sequence and Mutational Analyses of the pVir Plasmid of *Campylobacter jejuni* 81-176. Infect Immun. nov 2002;70(11):6242-50.
232. Batchelor RA, Pearson BM, Friis LM, Guerry P, Wells JM. Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different *Campylobacter* species. Microbiology (Reading). oct 2004;150:3507-17.

233. Biggs PJ, Fearnhead P, Hotter G, Mohan V, Collins-Emerson J, Kwan E, et al. Whole-genome comparison of two *Campylobacter jejuni* isolates of the same sequence type reveals multiple loci of different ancestral lineage. PLoS One. 2011;6(11):e27121.
234. Sheppard SK, Cheng L, Méric G, de Haan CPA, Llarena A-K, Marttinen P, et al. Cryptic ecology among host generalist *Campylobacter jejuni* in domestic animals. Mol Ecol. mai 2014;23(10):2442-51.
235. Wang Y, Taylor DE. Natural transformation in *Campylobacter* species. J Bacteriol. févr 1990;172(2):949-55.
236. Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. Protein Expr Purif. mai 2005;41(1):207-34.
237. Bencini DA, O'donovan GA, Wild JR. Rapid chemical degradation sequencing. Biotechniques. 1984;2(2).
238. Castillo F. Molecular characterization of XerS/*dif*SL site-specific recombination system in *Streptococcus suis*. 3 déc 2020;
239. Hoess RH, Ziese M, Sternberg N. P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. Proc Natl Acad Sci U S A. juin 1982;79(11):3398-402.
240. Hayes F, Sherratt DJ. Recombinase binding specificity at the chromosome dimer resolution site dif of *Escherichia coli*. J Mol Biol. 28 févr 1997;266(3):525-37.
241. Panigrahi GB, Sadowski PD. Interaction of the NH₂- and COOH-terminal domains of the FLP recombinase with the FLP recognition target sequence. Journal of Biological Chemistry. 8 avr 1994;269(14):10940-5.
242. Whiteson KL, Rice PA. Binding and Catalytic Contributions to Site Recognition by Flp Recombinase. J Biol Chem. 25 avr 2008;283(17):11414-23.
243. Guo F, Gopaul DN, Duyne GDV. Asymmetric DNA bending in the Cre-loxP site-specific recombination synapse. PNAS. 22 juin 1999;96(13):7143-8.
244. Guo F, Gopaul DN, Van Duyne GD. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. Nature. sept 1997;389(6646):40-6.
245. Pargellis CA, Nunes-Düby SE, de Vargas LM, Landy A. Suicide recombination substrates yield covalent lambda integrase-DNA complexes and lead to identification of the active site tyrosine. J Biol Chem. 5 juin 1988;263(16):7678-85.
246. Ghosh K, Lau C-K, Gupta K, Van Duyne GD. Preferential synapsis of loxP sites drives ordered strand exchange in Cre- loxP site-specific recombination. Nat Chem Biol. oct 2005;1(5):275-82.

247. Lee L, Sadowski PD. Directional Resolution of Synthetic Holliday Structures by the Cre Recombinase. *Journal of Biological Chemistry*. 1 août 2001;276(33):31092-8.
248. Lee L, Sadowski PD. Sequence of the loxP Site Determines the Order of Strand Exchange by the Cre Recombinase. *Journal of Molecular Biology*. 14 févr 2003;326(2):397-412.
249. Ennifar E, Meyer JEW, Buchholz F, Stewart AF, Suck D. 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*. 15 sept 2003;31(18):5449-60.
250. Kimball AS, Kimball ML, Jayaram M, Tullius TD. Chemical probe and missing nucleoside analysis of Flp recombinase bound to the recombination target sequence. *Nucl Acids Res*. 1995;23(15):3009-17.
251. Umlauf SW, Cox MM. The functional significance of DNA sequence structure in a site-specific genetic recombination reaction. *EMBO J*. juin 1988;7(6):1845-52.

Annexe



Xer Site Specific Recombination: Double and Single Recombinase Systems

Fabio Castillo*, Amal Benmohamed and George Szatmari*

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

OPEN ACCESS

Edited by:

Feng Gao,
Tianjin University, China

Reviewed by:

Ian Grainge,
University of Newcastle, Australia
Alan Leonard,
Florida Institute of Technology, USA
Gregory Marczynski,
McGill University, Canada

*Correspondence:

Fabio Castillo
fabio.andres.castillo.martinez@umontreal.ca
George Szatmari
george.szatmari@umontreal.ca

Specialty section:

This article was submitted to
Evolutionary and Genomic
Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 01 December 2016

Accepted: 03 March 2017

Published: 20 March 2017

Citation:

Castillo F, Benmohamed A and Szatmari G (2017) Xer Site Specific Recombination: Double and Single Recombinase Systems. *Front. Microbiol.* 8:453. doi: 10.3389/fmicb.2017.00453

The separation and segregation of newly replicated bacterial chromosomes can be constrained by the formation of circular chromosome dimers caused by crossing over during homologous recombination events. In *Escherichia coli* and most bacteria, dimers are resolved to monomers by site-specific recombination, a process performed by two Chromosomally Encoded tyrosine Recombinases (XerC and XerD). XerCD recombinases act at a 28 bp recombination site *dif*, which is located at the replication terminus region of the chromosome. The septal protein FtsK controls the initiation of the dimer resolution reaction, so that recombination occurs at the right time (immediately prior to cell division) and at the right place (cell division septum). XerCD and FtsK have been detected in nearly all sequenced eubacterial genomes including Proteobacteria, Archaea, and Firmicutes. However, in *Streptococci* and *Lactococci*, an alternative system has been found, composed of a single recombinase (XerS) genetically linked to an atypical 31 bp recombination site (*difSL*). A similar recombination system has also been found in ϵ -proteobacteria such as *Campylobacter* and *Helicobacter*, where a single recombinase (XerH) acts at a resolution site called *difH*. Most Archaea contain a recombinase called XerA that acts on a highly conserved 28 bp sequence *dif*, which appears to act independently of FtsK. Additionally, several mobile elements have been found to exploit the *dif/Xer* system to integrate their genomes into the host chromosome in *Vibrio cholerae*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Enterobacter cloacae*. This review highlights the versatility of *dif/Xer* recombinase systems in prokaryotes and summarizes our current understanding of homologs of *dif/Xer* machineries.

Keywords: site-specific recombination, tyrosine recombinases, single recombinases, XerS, XerH, XerA, IMEX

INTRODUCTION

Bacteria and archaea have developed a variety of well-regulated and coordinated mechanisms of replication and segregation of their genomes that ensure the genetic material is transmitted faithfully to the daughter cells, despite the absence of temporal separation between DNA synthesis, chromosome separation and cell division (Reyes-Lamothe et al., 2012). However, the circular state of their chromosomes and plasmids constitutes a constant threat to genome stability and proper segregation because of dimer formation during recombinational exchanges between sister chromatids. These rearrangements can combine their genomes into larger molecules, compromising an equal distribution of the genetic material to the daughter cells (Barre et al., 2001; Yates et al., 2003; Massey et al., 2004; Grainge et al., 2007). This topological problem was

fully addressed in 1981, when Austin et al. (1981) demonstrated that the stable inheritance of the prophage P1 was due to site-specific recombination (SSR), a specialized system that catalyzes DNA exchange between two defined DNA sequences, and which plays a major role in dimer resolution by converting multimeric forms to the monomeric forms. Later studies performed with the plasmid ColE1 connected SSR with plasmid monomerization and stability (Summers and Sherratt, 1984). Colloms et al. (1990), the site-specific recombinase (XerC) was identified as the first protein responsible for SSR on *cer*, followed by the identification of a second recombinase, XerD required for this reaction (Blakely et al., 1993).

THE DISADVANTAGE OF HAVING CIRCULAR DNA

In most bacteria and some archaea, replication begins at a single origin of replication *oriC* at which DnaA binds and stimulates the assembly of the replisome (Jha et al., 2016). Replication forks then proceed bi-directionally until the two replication forks meet in an antipodal terminus region flanked by *ter* sequences. These sequences in conjunction with the replication terminator protein (Tus) stop the replication forks to synchronize their arrival at the same time and place (Elshenawy et al., 2015; Gowrishankar, 2015; Pandey et al., 2015). However, chromosome replication is not a continuous process and is continuously halted by different types of DNA lesions such as UV irradiation, free radicals, genotoxic agents, DNA replication errors, transcription-replication conflicts, tightly bound protein-DNA complexes, or RNA secondary structures (Kuzminov, 1999; Tehrani et al., 2010; Ayora et al., 2011; Merrikh et al., 2012; Gowrishankar, 2015). To maintain their genomic integrity, bacteria have developed several and sophisticated mechanisms to minimize the frequency of these DNA lesions before the occurrence of replication. The initial barrier against deleterious DNA modifications is carried out by specialized mechanisms, each one required for a given type of lesion, such as proofreading, direct reversal of DNA damage, base excision repair, nucleotide excision repair and mismatch repair (Lenhart et al., 2012; Kisker et al., 2013; Groothuizen and Sixma, 2015; van der Veen and Tang, 2015). Additional groups of mechanisms are responsible for avoiding transcription-replication encounters, equally lethal for bacteria, such as the coordination of temporal and spatial gene activation and co-orientation, modulators of RNA polymerases (RNAPs) and replicative accessory helicases (Pomerantz and O'Donnell, 2010; Merrikh et al., 2012; Bruning et al., 2015; Roghanian et al., 2015). Nonetheless, it is unavoidable that some of this DNA damage or conflicts will escape the initial barrier and interfere with replication fork migration, leading to the eventual inactivation of the replication machinery and formation of double-strand breaks (DSBs), interstrand cross-links and single-stranded gaps (SSG). These represent critical forms of DNA damage that must be removed for chromosome replication and transcription to proceed (Heller and Marians, 2006; Yeeles et al., 2013). Therefore, a second barrier of repair is called into play to cope with these “evasive” damages. This second barrier

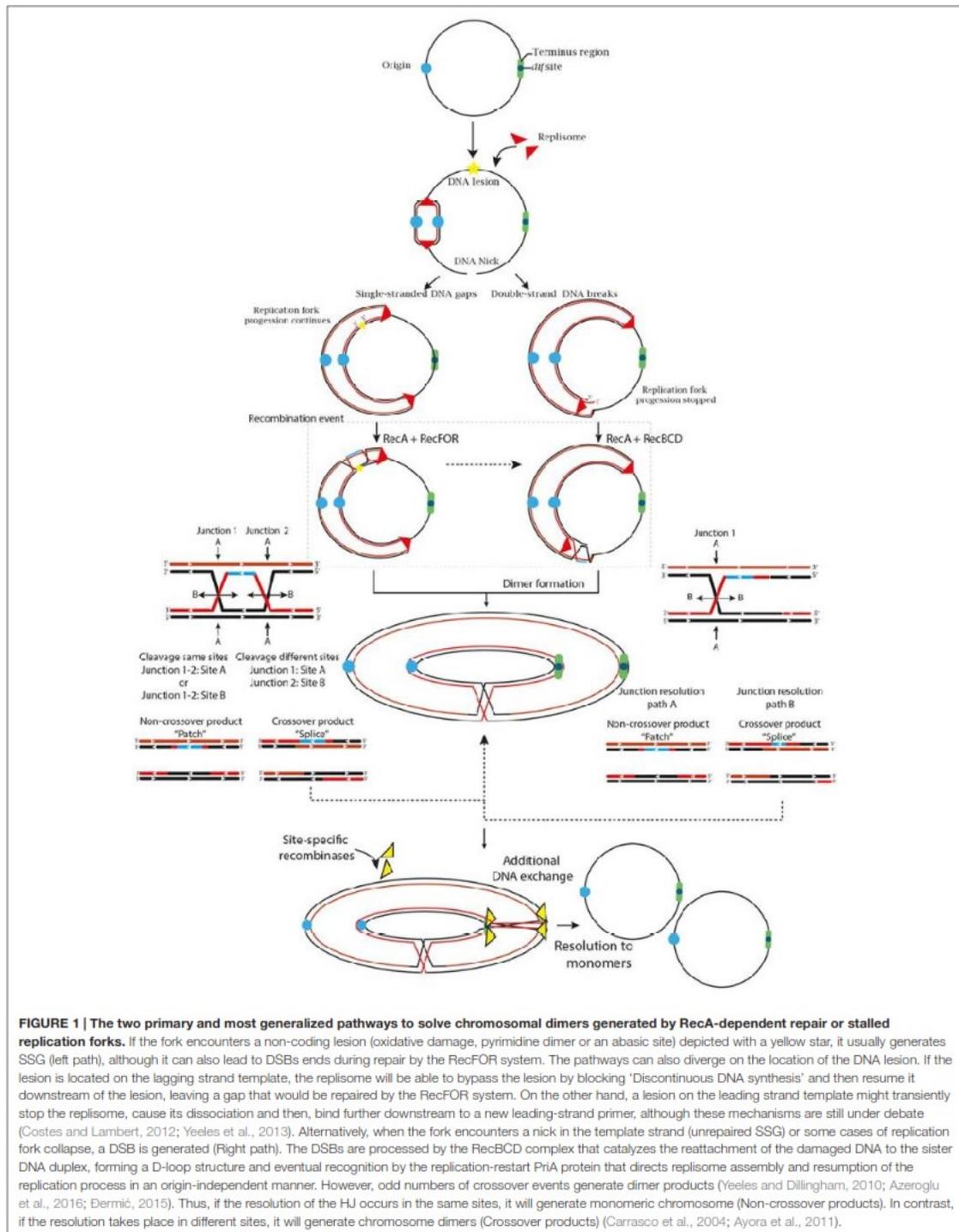
is preferentially carried out by the homologous recombination repair system (HR). Estimates indicate that HR repair is required in almost every cycle of replication (Cox et al., 2000; Vos and Didelot, 2009; Darmon et al., 2014). In fact, the HR system is now not only considered as a functional mechanism for generating genetic diversity but also as a decisive factor in DNA repair, the latter being the primary role of this system in the maintenance of the genome and the main source of dimer events (Rocha et al., 2005). Thus, HR plays a central role in removal and/or repair of DNA damage and rescue and/or re-assembling of replication forks that have been broken or stalled (Heller and Marians, 2006; Costes and Lambert, 2012). In the traditional HR system in *Escherichia coli*, its mode of action consists of a multistep process of breakage and rejoining of homologous sequences (one old and one newly synthesized DNA strand). It initially involves (1) recognition of the DNA lesion by the complexes RecBCD or RecFOR, depending on the type of DNA lesion; (2) formation of 3'-ssDNA overhangs processed by the *exo* and endonuclease activity of the Rec proteins, and subsequent coating by RecA; (3) strand invasion of the 3-terminal ssDNA into the homologous duplex DNA molecule and search of the complementary strand; (4) formation of a D-loop intermediate, transformation into a branched intermediate and Holliday junction (HJ) formation and (5) completion of the recombination process by resolution of the HJ, catalyzed by the systems RuvABC or RecG (Chen et al., 2008; Handa et al., 2009; Zhang et al., 2010). HJ resolution can result in two alternative products;

- ‘crossover’ or spliced products; where reassortment of the flanking genes of the cleavage site has occurred, obtaining one different genotype at one side compared to the former DNA duplex, and therefore, long range of genetic exchange.
- ‘non-crossover’ or patch products where the flanking regions were not exchanged, and instead, the resulting DNA duplex contain a ‘patch’ of hybrid DNA with a shorter range of genetic exchange (Cromie and Leach, 2000; Lilley and White, 2001).

Because circular chromosomes do not have “ends,” they are vulnerable to concatenation during formation of an odd number of crossover events. Thus, swapping DNA flanking regions tangles the sister chromatids and forms larger ring chromosomes that compromise cellular division (Figure 1) (Steiner and Kuempel, 1998; Barre et al., 2001). To ensure proper chromosomal segregation, bacteria and archaea have overcome these major threats by two broad mechanisms. One is to minimize the formation of crossing-over events, and the other is to solve dimer formation by performing an additional DNA exchange, immediately prior to cell division, at a specific region called *dif* (Deletion-Induced Filamentation).

AVOIDING DIMER FORMATION

One way to avoid dimer formation, as simple as it sounds, is to decrease the likelihood of dimer formation. This, however, is an intricate process of coordination and selection of



the right enzymes at the right moment. Therefore, if the resolution of HJ intermediates by endonucleolytic cleavage can only result in crossover or non-crossover products, the likelihood of obtaining one or another is 50%. However, minimizing crossover events during homologous recombination repair seems to be the rule rather than the exception in organisms with circular chromosomes (Martini et al., 2006). In *E. coli*, homologous recombination repair is processed by two predominant recombinational pathways; The RecBCD pathway associated with DSB repair, replication fork collapse, replication fork reversal and replication fork arrest, and the RecF pathway, which is mostly involved in the repair of SSG, and under certain conditions, can also repair DSBs (Labib and Hodgson, 2007; Johnston et al., 2015). Both mechanisms lead to the formation of HJs that are mostly resolved by the RuvABC complex in *E. coli* or RecU in Firmicutes and Mollicutes (Carrasco et al., 2004). Deletion of the genes of the RuvABC complex eliminates non-crossover formation bias, supporting the idea that bias formation mostly depends on the action of Ruv proteins more than Rec proteins (Cromie and Leach, 2000). This idea was initially discussed by Van Gool et al. (1999) who demonstrated that crossover and non-crossover products are not random and, conversely, they are influenced by the positioning and orientation of the resolvosome on the HJ intermediate, which in turn directs RuvC strand cleavage direction. Additionally, topological conditions such as DNA supercoiling, DNA catenation, adjacent HJ intermediates or the presence of double HJ intermediates can also influence assembly of the RuvABC complex on the HJ and indirectly affect resolution (Van Gool et al., 1999). Subsequently, Cromie and Leach (2000) showed that RuvABC positioning may depend on the nature of the substrate caused by the type of DNA lesion, thus DSBs are more likely to result in crossover products (Frequently processed by RecBCD) whereas SSG are more likely to result in non-crossover products (frequently processed by RecF). Although, some fractions of SSG can cause DSBs (Spies and Kowalczykowski, 2005). However, the specific causes of crossover or non-crossover formation are still under debate, and different reactions cannot be completely dismissed. A clear example of this is the fact that RecBCD as well as RecF are not restricted to DSBs and SSG respectively and, on the contrary, the both may have interchangeable functions (Pagès, 2016). That would explain why some replication fork arrests generate non-crossover products even if they are mostly processed by the RecBCD pathway (Michel et al., 2000), or why RecF contributes almost equally to dimeric chromosome formation in *E. coli* despite the fact that it is responsible for SSG resolution (Barre et al., 2001).

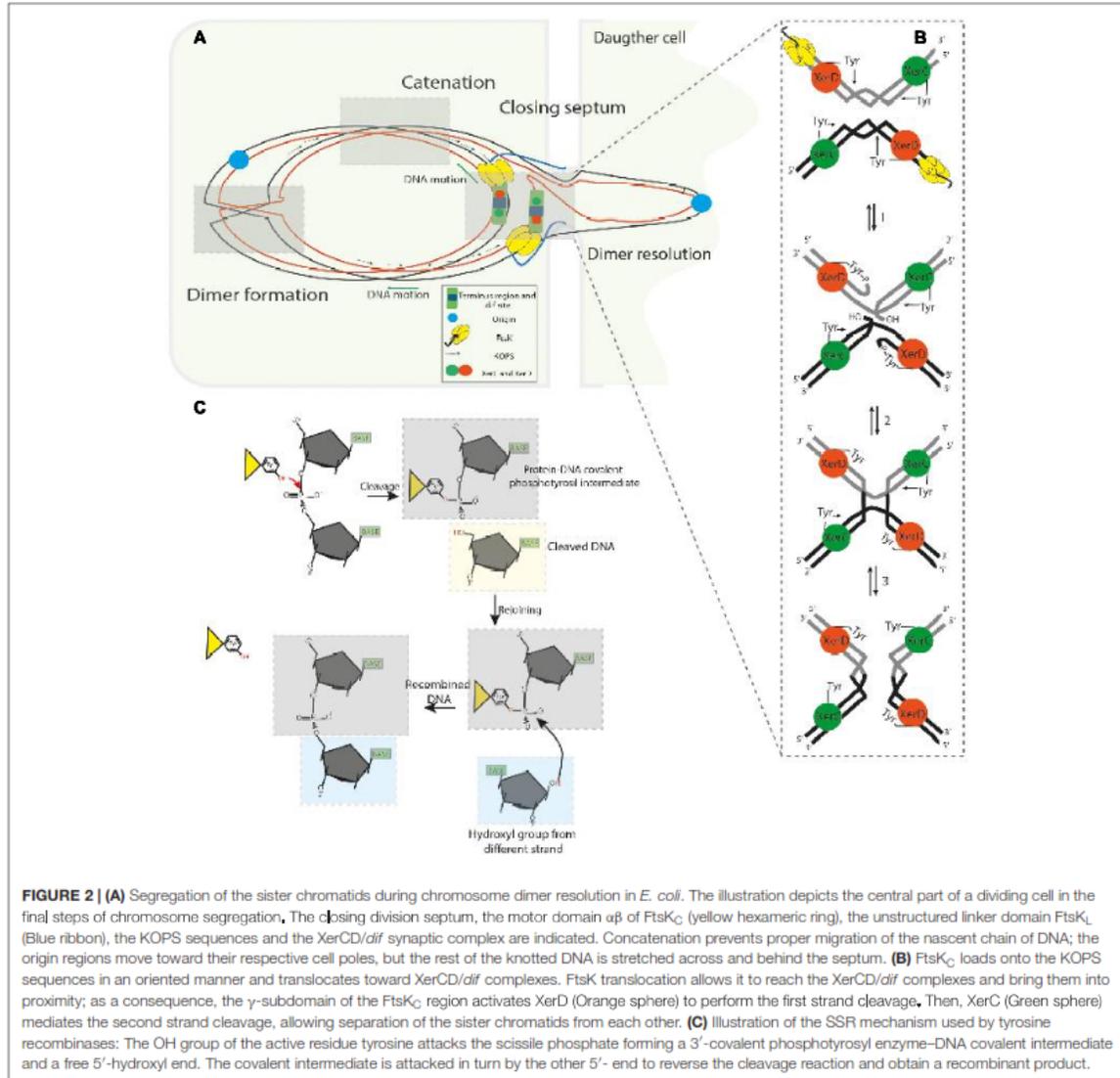
Interestingly, the fact that DNA lesions and transcription-replication conflicts are more abundant in the leading strand than in the lagging strand in *E. coli*, and that these lesions usually generate non-crossover products, reinforces the idea that organisms with circular chromosomes favored a system that minimizes dimer formation during HR repair completion (Cromie and Leach, 2000; Fijalkowska et al., 2012; Merrikh et al., 2012). These biased reactions have also been detected in other microorganisms such as *B. subtilis* where the resolvase RecU biases homologous recombination toward non-crossover

products (Carrasco et al., 2004). Despite this non-crossover preference by HR system in *recA*⁺ cells, dimer formation still occurs reaching 10–15% of the growing cells (Carnoy and Roten, 2009).

COPING WITH DIMERS

It is clear that dimer formation is regarded as a negative outcome that must be solved. Despite this, Mazin et al. (1996) proposed that under certain conditions of selective stress, plasmid dimerization could confer an advantage for the selection of adaptive mutations due to rapid accumulation and selection of plasmids carrying a specific mutation and subsequent segregation to the daughter cells. Berza et al. (2013) also reported that plasmid dimerization greatly increased synthesis of a foreign protein and that plasmid content is unaffected by dimer formation showing some advantages for transcriptional events. However, these benefits were only considered for plasmids. Regarding circular chromosomes, dimerization must be resolved by the action of site-specific recombinases (SSRs), which are enzymes that are responsible for breaking and rejoining specific sites without requiring DNA synthesis or high energy cofactors (Warren et al., 2013). The relevance of this system for proper chromosome segregation is supported by the high degree of conservation in Bacteria and Archaea. The Xer complex is considered one of the most conserved structural features in cells containing circular chromosomes, as well as RecA and FtsK enzymes (Carnoy and Roten, 2009; Kono et al., 2011; Diagne et al., 2014). The SSRs act on specific short DNA sequences, called recombination sites, where DNA exchange occurs in three different types of DNA rearrangements; deletion (divided into excision or resolution), insertion, or inversion. All these processes depend on the orientation and direction of the two recombination sites (Grindley et al., 2006) (Figure 1). All known site-specific recombinases are classified into two unrelated families, tyrosine-type or serine-type recombinases (Tyr or Ser) based on the amino acid residue that forms a covalent linkage between the protein and a phosphate at the DNA cleavage site (Hirano et al., 2011). Serine recombinases, often referred to as the resolvase/invertase family, act on a recombination site with just 2 bp separating the cleavage sites on top and bottom strands and the cleavages occur simultaneously to create a double strand break, while tyrosine recombinases, often referred to as the λ integrase family enzymes perform a two-step cleavage and rejoining process where the cleavage sites are separated by 6–11 bp. Each recombinase family possesses a distinct mechanism. Tyrosine recombinases are divided according to the recombination directionality; unidirectional or bidirectional recombinases. Whereas serine recombinases are divided according to their size; small or large recombinases (Grindley et al., 2006; Brown et al., 2011).

The chromosome dimer resolution (CDR) process and heritable stability were originally elucidated in *E. coli* (Stirling et al., 1988a; Colloms et al., 1990; Blakely et al., 1993; Sherratt et al., 1995, 2004), where two paralogous site-specific tyrosine recombinases, XerC (298 aa) and XerD (298 aa) (Chromosomally Encoded Recombinases) were shown to act on a 28 bp DNA



sequence (*dif* site), located in the *ter* region. The synaptic XerCD/*dif* complex consists of two XerC and two XerD subunits respectively bound to two *dif* sites (Figure 2B). Limited structural information of some tyrosine recombinases have revealed a conserved catalytic domain fold (Swalla et al., 2003), facilitating the analysis of experimental data and allowing the development of a general model for Xer recombinases (Meinke et al., 2016) consisting of; XerD (Subramanya et al., 1997), XerA (Hwa Jo et al., 2016), XerH (Bebel et al., 2016) and other related tyrosine recombinases like Cre (Gopaul and Van Duyne, 1999; Martin et al., 2002), HP1 integrase (Hickman et al., 1997), FLP (Chen et al., 2000) and λ integrase (Kwon et al., 1997; Biswas

et al., 2005). The *E. coli dif* site is divided into two 11 bp half-sites that share partial dyad symmetry linked by a 6 bp central region that defines the positions of strand cleavage and exchange (Kuempel et al., 1991). The initial step of SSR during dimer resolution requires the formation of a synaptic complex consisting of a tetrameric protein/DNA complex (four protomers of tyrosine recombinases and two recombination site duplexes). Once the synaptic complex is formed, two opposing and activated protomers cleave the DNA strand of each recombination site duplex. This occurs when the hydroxyl group of the nucleophilic tyrosine attacks the scissile phosphate in the central region to form a 3' phosphotyrosyl intermediate and a 5'-hydroxyl end.

This intermediate conserves the energy from the phosphodiester bond cleavage to perform the first strand exchange. The recently formed 5'-hydroxyl attacks the 3' phosphotyrosyl linkage on the partner site to reseal the strand breaks creating a HJ intermediate (Warren et al., 2013). HJ formation and isomerization activates the second pair of subunits bound to the other half of the recombination sites and inactivates the first pair of subunits. The second pair of subunits then cleaves, exchanges and rejoins the second pair of strands by the same mechanism just described; this second cleavage allows the resolution of HJ-intermediate and results in the recombinant DNA (**Figure 2B**) (Rajeev et al., 2009; Meinke et al., 2016). This process implies that the specific pairs of recombinases and/or active sites are continuously switched on and off to synchronize when and how recombination occurs, this coordination depends on allosteric interactions between the recombinases and external factors imposed on the synaptic complex (Hallet et al., 1999; Aussel et al., 2002; Vanhooff et al., 2009). In the XerCD/*dif* system, XerC normally initiates catalysis of one pair of DNA strands to form the HJ-intermediate without a subsequent resolution by XerD. Therefore, the HJs are rapidly converted back to the original DNA rearrangement. This XerC-first interaction is functionally active during the integration of certain bacteriophages that utilize Xer recombination to integrate their genomes into their host *dif* sites or in the resolution of plasmid multimers. In contrast, during chromosomal dimer resolution, pre-synapsed XerCD/*dif* complexes favor XerD activation by the FtsK protein to mediate the first strand exchange, generating a transient (XerD-HJ) intermediate, subsequent isomerization forms a XerC-HJ intermediate that is rapidly resolved to recombinant DNA by XerC, see below and **Figures 2A, 3A** (Zawadzki et al., 2013; Diagne et al., 2014).

ESTABLISHING RULES FOR DIMER RESOLUTION

One of the fundamental questions about SSR at *dif* concerns how the system is controlled to ensure a proper CDR into monomers in the right place and at the right time without promoting the reverse reaction, which would generate dimers from monomers. It is understood that Xer-mediated recombination mostly depends on an active HR system because it is the major process that provides concatenated chromosomes. However, catenation problems caused by replication may require Xer-recombination system as well (Recchia et al., 1999; Grainge et al., 2007; Midonet et al., 2014). This reaction occurs at two polarized and specific regions of ~10 kb at either side of *dif* called DAZ (dif Activation Zone), where oppositely oriented KOPS (FtsK Orienting Polar Sequences) converge and guide FtsK DNA translocation toward the *dif* locus (Pérols et al., 2000). This directional control is achieved by the interaction between the Xer recombinase system and the C-terminal domain of FtsK (Filamentous Temperature-Sensitive cell division protein K), a large division septum-associated DNA translocase, which coordinates chromosome segregation and cell division when chromosome organization has been affected (e.g., chromosome dimer formation, decatenation

or delayed replication) (Löwe et al., 2008; Graham et al., 2009; Grainge et al., 2011; Nolivos et al., 2012; Bisicchia et al., 2013; Besprozvannaya and Burton, 2014; Diagne et al., 2014). FtsK was initially documented in 1995 due to observations in *E. coli* TOE44 (AB2497 *ftsK44*) mutant cells and their ability to form long chains of cells due to a single substitution of one amino acid in the N-terminal domain (FtsK_N), by then, FtsK was thought to participate in septum formation as a peptidoglycan-modifying enzyme. Then, Yu et al. (1998) demonstrated that inactivation of the C-terminal region of FtsK affected normal chromosome segregation due to the formation of long chains of cells and detected abnormal DNA distribution in some *ftsKI::cat minB* double mutants of *E. coli* minicells. Finally, in Steiner et al. (1999) discovered that SSR at *dif* requires FtsKC and thus, CDR only occurs in its presence. The ~1329 aa FtsK protein can be divided into three domains; The ~279 aa N-terminal domain (FtsK_N) is responsible for attachment of the protein to the membrane by four transmembrane segments and interaction with other proteins of the division septum such as FtsZ (Berezuk et al., 2014). The linker domain FtsK_L, not commonly conserved in FtsK homologs, is primarily composed of proline-glutamine residues (Dubarry et al., 2010). Its length and composition varies between species, being ~650 amino acids long in *E. coli* and most of Proteobacteria, ~200 aa long in *Vibrios* (Val et al., 2008) or ~125 aa in *Pseudomonas* (Massey et al., 2006). Experiments performed by Bigot et al. (2004) demonstrated that *ftsK_L* mutations increased filamentation phenotypes even higher than *xer* mutants and that this filamentous formation did not correspond to problems in CDR. On the contrary, it was thought to be due to a deficient positioning of the protein, reducing the possibility of contact between FtsK_C and the DAZ region of the chromosome. Subsequently, Dubarry et al. (2010) revealed that different parts of the linker domain interact with other proteins of the divisome such as FtsQ, L, I and Z and these interactions help to stabilize the whole divisome at the site of septation. Interestingly, they also suggested that FtsK_L domain may stop or slow down cell division during dimer resolution because of the destabilization of the divisome components when FtsK_C has been pulled by the DNA during translocation, this force can separate FtsZ and delay septum constriction. There is also a proportional relation between the glutamine-proline concentration and its length, where the longest linkers are usually richer in these residues (Bigot et al., 2007). Following the linker, the highly conserved ~500 aa C-terminal domain (FtsK_C), usually referred as the motor of the FtsK, is comprised of three separated subdomains called α , β and γ . Structural studies of the translocation module FtsK _{$\alpha\beta$} of *Pseudomonas aeruginosa* demonstrated that it assembles as a hexameric ring around double-stranded DNA forming a central channel of 30 Å in diameter, where double stranded DNA (dsDNA) passes through (Massey et al., 2006; Demarre et al., 2013). Later structural studies of the orientation module FtsK _{γ} of *P. aeruginosa* and *E. coli* demonstrated that six γ subdomains are loosely attached by a short linker of 10 aa to the hexameric ring FtsK _{$\alpha\beta$} (Sivanathan et al., 2006; Löwe et al., 2008). The FtsK _{$\alpha\beta$} subdomains are responsible for the ATP hydrolysis-dependent DNA translocation of the protein. The 68 aa FtsK _{γ} subdomain is a

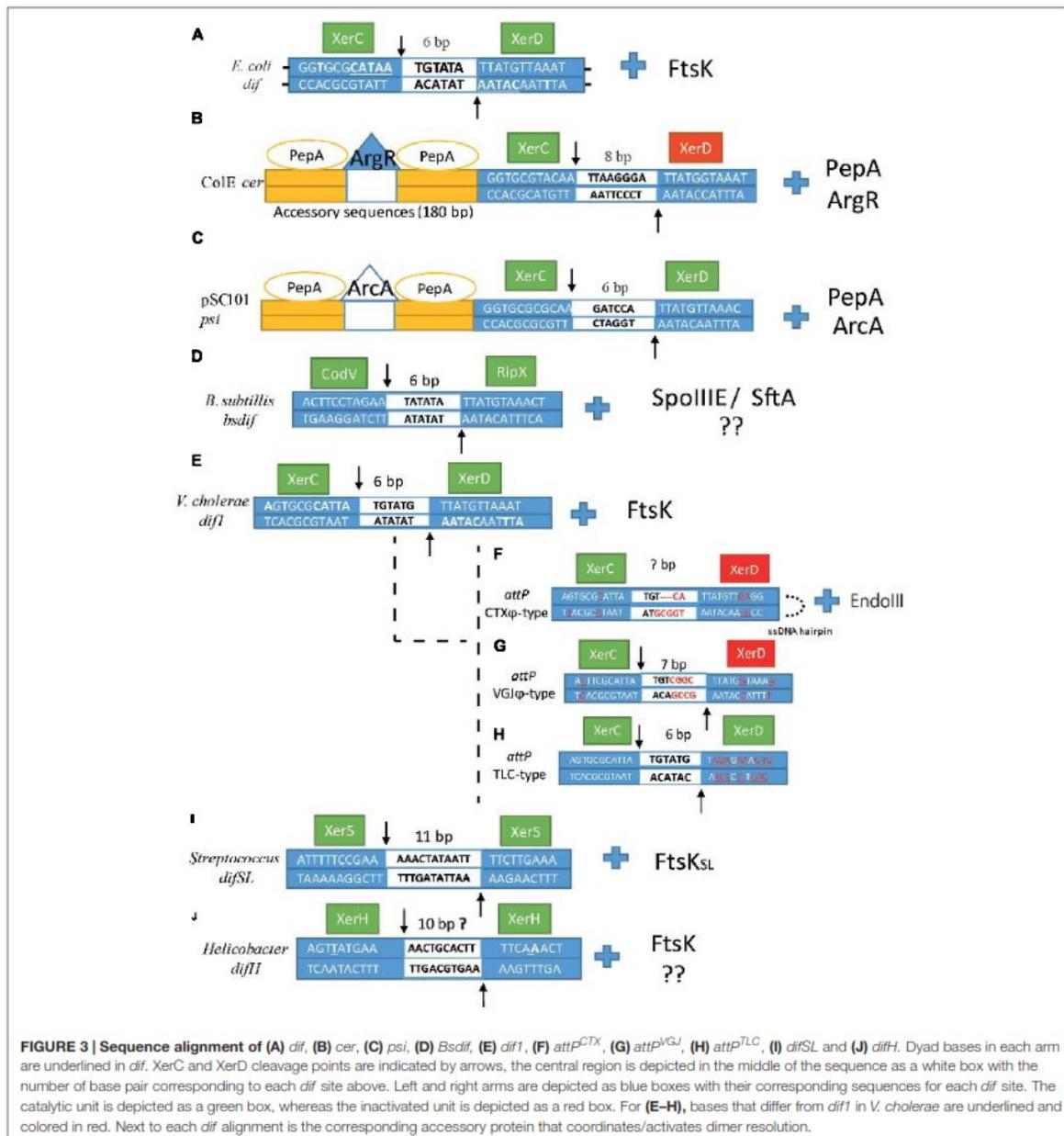


FIGURE 3 | Sequence alignment of (A) *dif*, (B) *cer*, (C) *psi*, (D) *Bsdif*, (E) *dif1*, (F) *attP^{CTX}*, (G) *attP^{VGJ}*, (H) *attP^{TLC}*, (I) *difSL* and (J) *difH*. Dyad bases in each arm are underlined in *dif*. XerC and XerD cleavage points are indicated by arrows, the central region is depicted in the middle of the sequence as a white box with the number of base pair corresponding to each *dif* site above. Left and right arms are depicted as blue boxes with their corresponding sequences for each *dif* site. The catalytic unit is depicted as a green box, whereas the inactivated unit is depicted as a red box. For (E–H), bases that differ from *dif1* in *V. cholerae* are underlined and colored in red. Next to each *dif* alignment is the corresponding accessory protein that coordinates/activates dimer resolution.

helix-wing-helix domain that performs two main functions. The first role of this subdomain is to recognize the 8 bp KOPS sites and then directs FtsK translocation toward the *dif* site located within the *ter* region, at which, if concatenation occurs, two *dif* sites will be brought together to form the synaptic complex XerCD/*dif* (Figure 2A). KOPS are over-represented on the leading strand of replication where their concentration gradually increases as *dif* is reached; indeed, more than 90% of KOPS

sequences nearby *dif* are located on the leading strand (Nolivos et al., 2012); giving a possible estimate of 34 KOPS motifs located in the DAZ region (Lee et al., 2014) with a frequency of 1 motif every 13Kb (Besprozvannaya and Burton, 2014). The second main function of the FtsK_γ subdomain is to activate the XerD catalytic function to generate the first HJ and subsequent dimer resolution (Grainge et al., 2011; Lee et al., 2014; Keller et al., 2016). How FtsK locates and assembles to initiate translocation

in the correct KOPS sequence is still arguable, for this reason two models have been proposed; the loading model and the target search model, recently reviewed by Besprozvannaya and Burton (2014). New evidence strongly suggests that FtsK acts in a 350-kb region around *dif* that covers 7% of the genome where monomers of FtsK_C assemble exclusively at KOPS motifs as described by the loading model. An initial interaction of a single monomer of FtsK_γ will trigger a rapid and stepwise formation of the hexameric ring under high concentration of FtsK (Graham et al., 2010; May et al., 2015). It is likely that FtsK_γ assembles quickly and binds to KOPS as a trimer initially, with three FtsK_γ modules interacting with consecutive GGG, NA, and GGG bases and then it hexamerizes gradually (Löwe et al., 2008). Once a KOPS motif is detected, allosteric modifications occur leading to hexamerization of FtsK_{αβ}, which alters the angular conformation of FtsK_γ on the DNA affecting KOPS recognition, and activates FtsK_{αβ} ATP hydrolysis. As a consequence, FtsK is no longer able to recognize subsequent KOPS motifs during translocation, unless FtsK migration is impaired, and KOPS recognition is obligated to restart (Sivanathan et al., 2006; Löwe et al., 2008; Crozat and Grainge, 2010; Lee et al., 2014). FtsK has been demonstrated to be the fastest known DNA translocase, reaching levels of 17.5 ± 3.5 kb/s at 37°C or even faster with a striking stall force and a slight supercoiling induction, 1 positive supercoil per every 150 bp translocated (Saleh et al., 2005; Graham et al., 2009; Lee et al., 2012). It has also demonstrated a striking capacity to displace, evict or bypass different obstacles, especially proteins bound to the DNA such as RNA polymerases (Lee et al., 2014). However, FtsK acts differently upon collision with RecBCD and XerD-XerCD/*dif* complex proteins. When FtsK collides with XerCD/*dif*, in a synapsed form, it activates XerD to create the XerD-HJ transient intermediate (structural rearrangements increase the distance between *dif* sites from about 53 to 67 Å²) (Zawadzki et al., 2013; Bebel et al., 2016) followed by a rapid dissociation from the DNA (dissociation takes to 0.5–1 s). Cleverly, May et al. (2015) demonstrated that recombination of the synaptic complex XerCD/*dif* takes 1 s longer than the FtsK dissociation time. Therefore, they suggested that this time span can provide a regulatory control for dimer resolution because concatenated chromosomes will reform XerCD/*dif* synaptic complexes every time that resolution failed. Thus, multiple sets of FtsK hexamers colliding multiple times against XerCD/*dif* synaptic complexes will increase the likelihood of generating recombinant products. This regulatory mechanism ensures monomeric products are formed during translocation of impaired DNA.

ALTERNATIVE *dif*/Xer RESOLUTION IN PROKARYOTES

Plasmid Resolution: Multicopy Plasmid ColE1 and Accessory Proteins

Plasmid dimerization and eventual multimerization has been termed as the “Dimer catastrophe” due to its deleterious effect in cell populations (Summers et al., 1993; Field and Summers, 2011).

Dimer catastrophe represents two major problems in bacteria; (1) unequal plasmid distribution among populations, in particular, multicopy plasmids that are more vulnerable to plasmid loss and (2) metabolic burden caused by the rapid accumulation of dimers into the host (Field and Summers, 2011; Million-Weaver and Camps, 2014). As mentioned previously, dimer resolution was originally elucidated in ColE1, resulting in the first functional characterization of XerC and subsequent identification of XerD by sequence homology to XerC (Blakely et al., 1993). These discoveries constituted a new approach for site-specific recombinases and their role in dimer resolution. Subsequent investigations led to the identification of SSR enzymes involved in dimer resolution in other plasmids of *E. coli*, and other bacteria. Current estimates have identified more than 1300 tyrosine recombinases where many of them are associated with other host proteins to regulate their activity, directionality, or processivity (Meinke et al., 2016). Large plasmids usually carry their own recombinase machineries adjacent to the recombination site. Whereas, small plasmids, like those in the ColE1 family, use the chromosomally encoded dimer resolution system of their host (Sengupta and Austin, 2011; Crozat et al., 2014). For ColE1 resolution, XerC/D proteins act on a specific site called *cer* (Figure 3B), a non-coding region of 280 bp where two additional proteins act with XerCD to catalyze SSR reactions: the arginine repressor (ArgR) (an arginine-dependent DNA binding protein originally called XerA) (Stirling et al., 1988a,b), and aminopeptidase A (PepA) (a bifunctional transcriptional regulatory protein that reacts to environmental signals, which was originally called XerB) (Stirling et al., 1989). SSR in *cer* is catalyzed by XerC within a sequence of 30 bp composed of two 11 bp half sides and a central region of 8 bp. XerC and XerD bind to the left and right halves cooperatively and respectively. Strand exchanges are catalyzed by XerC to form a HJ intermediate that is eventually resolved by an uncharacterized cellular HJ resolvase to generate a recombinant product (Colloms et al., 1996; Cornet et al., 1997). The *cer* site is comprised of a 30 bp core recombination site and two accessory DNA sequences of ~180 bp in length, in which one or two hexamers of PepA and one hexamer of ArgR control the reaction (Colloms, 2013). The two accessory proteins are necessary for recombination, since in their absence, plasmid dimer resolution cannot be completed. However, at abnormal high concentrations of PepA, recombination *in vitro* can proceed without the help of ArgR (Reijns et al., 2005; Sénéchal et al., 2010). This is also seen at the recombination site *psi* of plasmid pSC101 which requires XerC, XerD and PepA but not ArgR (*psi* dimer resolution requires another accessory protein called ArcA instead of ArgR, and the cleavage reaction is performed by XerC and XerD) (Cornet et al., 1994; Colloms et al., 1996). In *cer*, PepA and ArgR control recombination directionality so that dimers can only be converted into monomers and not the opposite reaction. Dimer resolution directionality caused by these two proteins involves the formation of two directly repeated *cer* sequences positioned in an antiparallel direction; this conformation is favored by negative supercoiling where the *cer* sequences are interwrapped three times around the proteins resulting in the formation of a right-handed synapse structure that brings the XerCD binding

sites together. Sites in an inverted repeat position prevent right-handed formation; this ensures only dimer resolution occurs. Thus, XerC and XerD bind to the 30 bp *cer* synapse region and may interact with the N-terminal domains of the PepA hexamers. Whereas the ArgR protein, which is flanked by one or two PepA hexamers, might be involved in bending the DNA, tightening it and activating *cer* SSR by possible interaction with the C-terminal region of the Xer recombinases. Another possible function is to bring the two *cer* sites together and to allow PepA loading to form a nucleoprotein complex that promotes XerCD binding and recombination (Reijns et al., 2005; Sénéchal et al., 2010; Colloms, 2013). Additionally, *cer* also encodes for a 70 nt RNA fragment called Rcd that is only transcribed during dimer formation by the P_{cer} promoter and regulated in a sequence-specific manner by the FIS protein (Blaby and Summers, 2009). Rcd binds to the enzyme tryptophanase and induces a quiescent state by increasing indole production within the cell. The quiescent state permits the cell to arrest cell division and chromosomal replication but still be active metabolically. This process is thought to be part of a dimer formation checkpoint that allows the XerCD/*cer* system to resolve dimer formation during this pause (Field and Summers, 2011).

The *Bacillus subtilis* Model and the Effect of Two Translocases

The capacity to perform SSR to resolve chromosome dimers is highly distributed among bacteria and archaea. Thus, homologs of XerC and XerD have been sequenced in a variety of species (Wang et al., 2013; Crozat et al., 2014). In *B. subtilis*, two homologs of XerC and XerD called CodV and RipX perform dimer resolution at a 28 bp *dif* site (*Bsdif*) close to the terminus region (Figure 3D). The *Bsdif* region is comprised of two 11 bp half-sites with imperfect dyad symmetry where CodV and RipX bind simultaneously and a 6 bp central region where DNA exchange occurs. Both CodV and RipX share a 37 and 44% identity with the XerC and XerD respectively, and 39% between them (Sciochetti et al., 1999). CodV binds preferentially to the left half-site and preferentially cleaves the top strand whereas RipX is able to bind to both sides with preferential binding to the right-half-site and preferential cleavage of the bottom strand. Cleavage by CodV is more efficient than cleavage by RipX, which suggests that CodV performs the first strand cleavage followed by RipX in *in vitro* experiments (Sciochetti et al., 2001). Sciochetti et al. (1999) also demonstrated that RipX could interact effectively with the *E. coli dif* site, unlike CodV which showed a weaker interaction with this substrate. However, addition of XerC to RipX/*dif*_{*E. coli*} or XerD to CodV/*dif*_{*E. coli*} generated larger complex formation in gel retardation analysis, demonstrating protein-protein interactions between these four proteins, which confirms some conserved features of tyrosine recombinases among bacteria. This is supported by the fact that the right half-site presents highly conserved features with respect to other *dif* sites among some bacteria, whereas the left-half site is less conserved, which could explain why RipX can bind *dif*_{*E. coli*} (Sciochetti et al., 2001). In contrast to *E. coli*, the synaptic complex can be brought together by the action of two DNA translocases: the membrane-associated SpoIIIE protein (Stage III

Sporulation Protein E) and the soluble SftA protein (Septum-associated FtsK-like Translocase of DNA). Both translocases harbor AAA+-ATPase and C-terminal domains with 56% of sequence similarity between them. SftA exhibits 50% identity with respect to the *E. coli* FtsK γ domain whereas SpoIIIE exhibits a 50% of similarity to the FtsK $\alpha\beta$ subdomain and 42% of similarity to the FtsK γ subdomain of *E. coli* (Barre, 2007). The N-terminal domains of these proteins are more divergent; SpoIIIE and FtsK share 36% of identity to respect to the four transmembrane helix whereas SftA lacks the transmembrane spanning domain (Wu, 2009; Kaimer et al., 2011). N-terminal domain variations coincide with their different location and activation in the genome. FtsK and SpoIIIE share a similar mechanism to anchor to the inner membrane of the dividing cell by their N-terminal regions; this transmembrane interaction is possibly reinforced by interactions with FtsZ or other cell division components such as FtsA or ZapA (Dubarry et al., 2010). During vegetative growth, SpoIIIE shows two predominant states: a static phase, where SpoIIIE is assembled close to future sites of cellular septation, and a mobile phase, where SpoIIIE does not occupy a specific position. Once cellular division begins, the static phase takes place when SpoIIIE is recruited by FtsZ and other division machinery proteins and is escorted to the center of the division septum (Fiche et al., 2013). SpoIIIE remains in the invaginating septum and hexamerizes independently of the cell division stages (Vegetative, division and sporulation stages) and independently of DNA interaction (Cattoni et al., 2014), suggesting that SpoIIIE assembly may not be restricted to the presence of impaired DNA and on the contrary, may be involved in normal DNA segregation as demonstrated by (Fiche et al., 2013). Experiments using high-resolution microscopy revealed that under formation of asymmetric (sporulation) or symmetric (vegetative growth) septa, the SpoIIIE concentration increased 2.5-fold around the constricting septa, even without evident formation of the septa, indicating close interaction with other components of the division machinery, that in turn regulates its activity under specific conditions (Fiche et al., 2013). SftA can be localized either to the cell center or more frequently, to the forming division septum. Although SftA lacks an integral membrane domain, the FtsZ ring recruits the enzyme and attaches it to the division septum during the initiation of cellular division, which explains its localization through the cell cycle (Kaimer et al., 2009, 2011; Kaimer and Graumann, 2011). These patterns of localization suggest that both translocases (SftA and SpoIIIE) are present at the septum at various times of segregation and that they perform DNA migration independently of each other, although SftA is only involved in DNA cytokinesis in contrast to SpoIIIE that may be involved in cytokinesis and cell division processes (Kaimer et al., 2009). DNA translocation is initially carried out by SftA during septation, probably by recognition of the 8-nucleotide SRS motifs (SpoIIIE Recognition Sequences) which are similar to the *E. coli* KOPS sequences. The SRS motifs are mostly located on the leading strand (up to 85%), and direct translocation toward the *Bsdif* site (Besprozvannaya and Burton, 2014). Therefore, the primary function of SftA consists of moving chromosomal DNA until the *ter* regions are positioned at midcell and the origin regions migrate to each pole of the cells.

The SftA may also be required for other proteins involved in cytokinesis and FtsZ positioning (Biller and Burkholder, 2009). SpoIIIE, the second translocase in *B. subtilis*, may take over DNA translocation working synergistically but not interchangeably with SftA, it can also function as a DNA segregation checkpoint preventing membrane fusion until chromosome segregation is completed (Kaimer et al., 2011; Fiche et al., 2013). Cattoni et al. (2014) suggested that SpoIIIE binds non-specifically to the DNA in a pre-formed hexameric open ring conformation and then searches for SRS motifs without hydrolysis of ATP. Similarly to FtsK proteins, SRS recognition by the SpoIIIE_γ domain triggers allosteric modifications that activate the ATPase activity of SpoIIIE_{αβ} and therefore, DNA translocation (Besprozvannaya et al., 2013). Once it encounters SRS motifs, the hexameric ring changes to the closed and active form pumping the chromosome in an oriented manner by recognizing further SRS motifs and translocating it toward *Bsdif* (Cattoni et al., 2014). As mentioned before, SpoIIIE is actively expressed in all growing cells and is essential during sporulation to translocate the remaining DNA from the mother cell into the forespore compartment, and during vegetative growth to guarantee that concatenate formation or disrupted genomes will not affect normal cellular division. Moreover, SpoIIIE is also required for septal membrane fusion after completion of chromosome translocation. During sporulation, asymmetric septation encloses the DNA and traps 25–30% of one chromosome into the forespore. SpoIIIE pumps the remaining 70–75% by an analogous mechanism used by FtsK; the reaction only takes 20 min demonstrating its incredible speed (Demarre et al., 2013; Bose et al., 2016). The mechanism of SpoIIIE DNA translocation through the membrane is still unclear, since recent single molecule-imaging experiments still provide valid information for two main models; the paired DNA conducting channel model (Burton et al., 2010; Yen Shin et al., 2015) and the aqueous channel model (Fiche et al., 2013). This system of both translocases has been also detected in *Staphylococcus aureus* termed FtsK and SpoIIIE because of their amino acid homology to SpoIIIE and FtsK from *B. subtilis* and *E. coli* respectively. However, in contrast to *B. subtilis* system, in *S. aureus* both enzymes seems to present a redundant, although independent role in DNA segregation. Individual deletions of either FtsK or SpoIIIE did not exhibit major changes in chromosome segregation for *S. aureus*, however, when combined together they represented a major threat for *S. aureus* genome stability (Veiga and Pinho, 2016).

Consistent with their different roles, SftA and SpoIIIE do not colocalize during vegetative-replicative stages or sporulation. Thus, SftA in concert with FtsZ and division proteins moves chromosomal DNA away from the closing division septum. Then, upon septum closure, entrapped DNA is translocated through the SpoIIIE pore or channels into the correct compartment (either a forespore or a daughter cell). However, unlike FtsK that activates XerCD recombination reactions, neither SftA nor SpoIIIE directly activate CodV or RipX recombinases. In this case, SftA and SpoIIIE affect the CodV/RipX reaction by proper positioning of the *ter* region, but there is no evidence of direct interaction between these enzymes to date (Biller and Burkholder, 2009; Kaimer et al., 2011).

Multichromosome Bacteria and IMEX

Vibrio cholerae, as well as 10% of sequenced bacteria to date, possess a very distinct property among bacteria; it harbors more than one chromosome (Jha et al., 2012). One ancestral chromosome I (chrI) of 2.96 Mbp and one plasmid-derived chromosome II (chrII) or 'chromid' of 1.072 Mbp, encode 2,775 and 1,115 ORFs, respectively. ChrI contains most of the housekeeping genes whereas chrII contains essential genes specialized in adaptation to new environments or pathogenicity (Xu et al., 2003; Harrison et al., 2010; Kirkup et al., 2010; Val et al., 2016). Harboring two or more chromosomes have shown to be highly heritable among these bacteria, which suggests that multiple chromosomes offer a positive selective pressure to maintain them. One possible explanation is that multiple chromosomes might offer an advantageous feature against dimer formation. Val et al. (2008) showed that dimer formation increases exponentially in relation to the size of the replicons, thus, dividing a single replicon into two or more replicons may reduce this topological problem. However, genome size might not be relevant for the presence or absence of Xer/*dif* recombination machinery. Some large chromosomes do not require Xer/*dif* recombination machinery as in some *Legionellales* (genome size ranging from 2 to 5 Mb) whereas some small-sized chromosomes still require Xer/*dif* recombination machinery as demonstrated by some *Rickettsiales* (genome ranging from 0.85 to 1.52 Mb in size) (Carnoy and Roten, 2009).

Homologs of XerC/XerD and FtsK have been characterized on chrI, referred as XerC_{VC} and XerD_{VC} with 53 and 68% of amino acid similarity to *E. coli* XerC and XerD, respectively (Huber and Waldor, 2002; McLeod and Waldor, 2004). Whereas chrII does not encode any Xer recombinase involved in dimer resolution, *dif*-like sequences are present in both chromosomes (*dif1* and *dif2*) located near GC skew shift-points (Val et al., 2008; Kono et al., 2011). Interestingly, both *dif* sites differ from each other in their sequences, *dif2* harbors five different nucleotides compared to *dif1* and most α -proteobacterial *dif* sites, four of them in the central region, resembling *dif*-like plasmid composition (Kono et al., 2011). Dimer resolution in *V. cholerae* requires FtsK_{VC} translocation by recognition of KOPS-like motifs (GGGNAGGG) in a similar way to that found in *E. coli*. Once the *dif* sites are brought together nearby, FtsK_{VC} activates XerD_{VC}, which is positioned to cleave the bottom strand, and perform the first strand cleavage. Then XerC_{VC} cleaves the top strand and performs the second strand cleavage; these reactions are carried out on both chromosomes at their respective *dif* sites (Figure 3E) (Val et al., 2008). Additional studies demonstrated that *E. coli* FtsK was able to activate 50% of the XerCD_{VC} synaptic complexes at *dif1* whereas only 20% of XerCD_{VC} were activated at *dif2*, suggesting that the *dif2* recombination process requires more accurate interactions between the FtsK proteins and the XerCD complex (Val et al., 2008). An additional feature of multiple chromosomes is their capacity to synchronize replication termination at the same time despite their different sizes (Val et al., 2016). This capacity may confer an additional regulatory control against dimer formation due to the time-lapse between the replicated chromosomes and cellular division. Demarre et al. (2014) showed that *terII* sites (chrII) separate

earlier than *terI* and that this early separation keeps *terII* sites at midcell by the macro domain MatP/*mats* organization system. This restriction during concatenation induces several collisions at midcell between *terII* sites, increasing the number of recombinational events and the likelihood of dimer resolution. It also ensures that *ter* sites of bacterial chromosomes remain exclusively in mid-cell to be processed by FtsK.

Although XerC and XerD recombinases normally perform dimer resolution, they are also exploited by other replicons such as plasmids, bacteriophages, and other integrative elements. Indeed, initial studies on plasmid stability in ColE1 and phage integration of bacteriophage λ led to the discovery of XerC and the mechanistic insights of the tyrosine family (Meinke et al., 2016). In *V. cholerae*, the causative agent of the potentially fatal human disease cholera, XerC_{VC} and XerD_{VC} are hijacked by some vibriophages to integrate their genomes into the chromosome. They are usually referred to as IMEX (Integrative Mobile Elements Exploiting Xer), and the best known ones are VGJ ϕ (Vibrio Guillermo Javier filamentous phage), TLC ϕ (Toxic Linked Cryptic), and CTX ϕ (Cholera Toxin Phage). CTX ϕ is a lysogenic [(+)ssDNA] filamentous bacteriophage that encodes the A-B type enterotoxin CT in *V. cholerae* (Das, 2014). These three vibriophages harbor a particular attachment site (*attP*), a *dif*-like site that serves to classify the three different groups of IMEX, (CTX ϕ -type, VGJ ϕ -type and TLC ϕ -type) (Das et al., 2013). Although the components to integrate their genomes are very similar, their mechanisms of integration differ from one to the other and from their host strains. Direct ssDNA integration by CTX ϕ -type phages is characterized by the formation of a \sim 150 bp folded structure created by the intra-strand base pairing interaction between two palindromic *attP* sites (*attP1* and *attP2*) separated by 90 nt on the ssDNA sequence (Figure 3F) (Das, 2014). The two overlap regions *attP1* and *attP2* resemble the XerC_{VC} side of *dif1* and *dif2* regions but differ from the XerD-side. This lack of homology between XerD_{VC} recognition site and *attP*_{CTX ϕ} limits the catalytic reaction to XerC_{VC} that catalyzes the complete reaction. An additional host factor called EndoIII participates in the directionality of the reaction, which blocks further rounds of strand cleavage by XerC_{VC} causing its dissociation and therefore preventing CTX ϕ excision (Bischerour et al., 2012). Although XerD_{VC} is not involved in the catalytic reaction, it is still necessary for a successful integration, probably by its role in synaptic complex formation (Val et al., 2005). Once the integration is completed, host DNA replication proteins resolve the formed HJ intermediate and convert it to dsDNA. Prophage CTX ϕ cannot be excised from its host since it loses the capacity to fold itself, which in turn prevents further base-pairing interactions between the *attP* sites, which ultimately abolishes the XerC_{VC} catalytic reaction (Das, 2014). Interestingly, CTX ϕ integration in El Tor strains is only found in chrI, and it is generally associated with two other vibriophages, TLC ϕ and RS1 that enable CTX ϕ integration in *V. cholerae* genome by reconstituting a functional *dif* site, and by promoting CTX ϕ replication and transmission (Hassan et al., 2010). In the classical biotype strains, CTX ϕ usually targets both chromosomes (Faruque and Mekalanos, 2012).

Similarly, to CTX ϕ , VGJ ϕ integration uses the XerC_{VC} catalytic reaction at the *dif1* site, but unlike CTX ϕ , it only harbors one *dif*-like attachment site (*attP*_{VGJ ϕ}) of 29 bp that allows its integration into the chromosome as a dsDNA. The *attP* central region contains four different nucleotides close to the XerD binding side with respect to the central region of the *dif1* site (Figure 3G). The lack of homology at the XerD_{VC} central region side prevents XerD_{VC} participation in the catalytic reaction. Once integrated, prophage VGJ ϕ acquires two *attP* sites (*attPL* and *attPR*), equally functional for the XerC_{VC} excision reaction, in contrast to CTX ϕ , where Xer recombinases can process VGJ ϕ excision from the host genome (Das et al., 2013). TLC ϕ also depends on host encoded Xer recombinases for its integration. Its *attP*_{TLC ϕ} site possesses high homology with the XerC_{VC} binding side and central region of *dif1* whereas it is highly divergent from the XerD_{VC} binding site (Figure 3H). The prophage form of TLC ϕ is almost always linked to CTX ϕ integration confirming the regular synergistic interactions found in most IMEX. Paradoxically, despite the lack of homology between the XerD binding sites of *dif1* and *attP*_{TLC ϕ} , TLC ϕ integration/excision is mediated by XerD_{VC} and then completed by XerC_{VC} resembling dimer resolution in bacteria, but independently of FtsK participation (Midonet et al., 2014).

IMEX are recombination platforms that permit bacteria to evolve and adapt through the acquisition and reordering of relevant genes. They have strengthened bacterial evolution, playing an important role in the rise of multidrug resistance, gene transfer mechanisms and virulence factors among clinically relevant bacteria (Fournes et al., 2016; Midonet and Barre, 2016). Besides the vibriophages just described above, some other relevant IMEX have been found; the gonococcal genomic island (GGI) related to pathogenic *Neisseria* species (Domínguez et al., 2011) and the EludIMEX-1 found in *Enterobacter ludwigii* (Antonelli et al., 2015). GGI is an unusually long IMEX (57 kb long) found in almost 80% of *Neisseria gonorrhoeae* strains and is involved in the expression of type IV secretion system (T4SS) genes (Christie et al., 2014). GGI carries a degenerate *dif* site called *dif*_{GGI} of 28 bp with a XerC-binding site and a central region homologous to the conserved *Neisseria dif* site (*dif*_{Ng}) and a divergent XerD-binding site. GGI insertion into the *Neisseria* genome follows a CDR-like process where FtsK activates XerD to perform the first strand cleavage between *dif*_{Ng} and *dif*_{GGI} followed by isomerisation of the synaptic complex and activation of XerC to perform the second strand cleavage, creating a GGI integrated form with two active Xer binding sites. Interestingly, the GGI synapse has given important clues about how IMEX might remain integrated in the host genome despite the presence of *dif* sites. Fournes et al. (2016) revealed by experiments *in vitro* that a trimeric form of the *E. coli* FtsK protein (t-FtsK $\alpha\beta\gamma_{Ec}$) was unable to activate XerCD recombination at one of the two *dif* sites (the *dif*_{GGI} site), in fact, the XerCD/*dif*_{GGI} complex was unable to stop t-FtsK $\alpha\beta\gamma_{Ec}$ translocation. As a consequence, the XerCD complex is dissociated from *dif*_{GGI} and the excision process is inhibited.

EludIMEX-1 is a 29.1-kb IMEX found in *E. ludwigii* (ECAA-01) that carries the *bla*_{NMC-A} gene that encodes for a serine carbapenemase. It was first characterized by Antonelli

et al. (2015) when they sequenced the whole genome of a NMC-A-positive isolate of *E. ludwigii*. The results indicated the presence of a new 29-kb region with lower GC content when compared to the bacterial genome, indicating a possible gene transfer acquisition (Wu et al., 2012). Further analysis revealed that this region is flanked by putative XerC/XerD recombination sites with high homology at the XerC-binding site. They also determined that EludIMEX-1 insertion site in the genome was the same for two distinct species of the *E. cloacae* complex suggesting a possible acquisition via a XerC/XerD dependent recombination event at a specific *dif*-like site (Antonelli et al., 2015). Understanding of IMEX control and excision processes will provide us a better idea of how counteract the acquisition of antibiotic resistance genes in pathogenic microorganisms.

The *difSL*/XerS Model

The *E. coli* pathway of dimer resolution has been found to be highly conserved among bacteria with circular chromosomes. It was initially demonstrated by Recchia and Sherratt (1999) when they analyzed 16 eubacterial and five archaeal genomes for XerCD-CodV/RipX homologs. They showed that most eubacterial genomes possess two putative Xer recombinases whereas Archaea presented a single recombinase in three of the five genomes analyzed (Recchia and Sherratt, 1999). Subsequently, Carnoy and Roten (2009) demonstrated by doing an exhaustive computational analysis of 234 chromosomes from 156 proteobacterial species, that 87.8% of the genomes analyzed presented XerCD-like and *dif*-related sequences. Moreover, Kono et al. (2011) predicted by a recursive hidden Markov model method (including XerCD orthologs) that 578 out of 592 bacterial genomes with a single chromosome and 63 out of 66 genomes with multiple chromosomes presented a *dif*-like sequence. Additionally, they remarked how XerC and XerD are conserved in almost 60–70% of bacterial species, and 85% in proteobacterial species (Debowski et al., 2012). These results among many others led to the general view that the *E. coli* pathway is predominant for dimer resolution. However, dimer resolution machinery or regulation of strand exchange may differ: some processes may require or disregard accessory proteins, others may or may not require activation by translocases, some will be mediated by a XerC-first strand exchange whereas others by XerD-first strand exchange and others may need two recombinases or only one. Among these divergences and unique characteristics for each bacteria to solve dimer formation, the less studied ones are the unconventional single recombinases.

Recchia and Sherratt (1999) first mentioned the presence of single recombinases from the identification of two eubacterial genomes harboring only one Xer homolog. It was later confirmed when Le Bourgeois et al. (2007) demonstrated that some species of *Lactococcus* and *Streptococcus* use an alternative Xer recombination machinery. This new Xer complex is based on a single tyrosine recombinase called XerS (356 aa) that acts on an atypical 31 bp recombination site called *difSL* in the presence of dimers. Unlike *E. coli*, the *xerS* gene is found immediately adjacent to the recombination site *difSL* acting

as a single module. The *difSL* site differs from most *dif* sites because of its large central region of 11 bp as opposed to the normally found 6–8 bp in all other *dif* regions (Figure 3I) (Leroux et al., 2011). Thus, *difSL* consists of two imperfect inverted repeat sites of different sizes separated by the central region where DNA exchange occurs. The inverted repeat region is one nucleotide longer in *difSL* and contains an extra nucleotide in the middle of the right inverted repeat (TTTTCTTGAAA) versus the left part of the sequence (TTTCCGAAAA). This additional spacing suggests XerS/*difSL* may be biased to favor binding in one-half site over the other. It was later confirmed by Leroux et al. (2011), where they also showed that XerS presented stronger interaction with the left-half site of *difSL* than the right-half site, and a preference for initiating the recombination reaction on the bottom strand of the *difSL* site. These results indicate that, although the *difSL* site is relatively symmetric and XerS is a single tyrosine recombinase, there is a bias for where the proteins initially bind to *difSL* and where they initiate the strand cleavage reaction. Thus, the left-bound monomer could activate the right-bound monomer by bending the DNA or changing the conformation of the second monomer which could explain the preferential cleavage and exchange of the bottom strand. This behavior resembles what XerC displays with weak binding but stronger strand exchange when compared to XerD (Nolivos et al., 2010; Leroux et al., 2011). This intrinsic bias alone cannot control the preference of the directionality of the strand cleavage reaction. The achievement of proper control requires the action of a SpoIIIE-like homolog translocase called FtsK^{SL}, a protein of 758 aa in length in *Streptococcus mutans* or 816 aa in *S. agalactiae* with low similarity at the N-terminal region between them. This low similarity does not affect its binding preference to the division septum commonly found in most proteins of the FtsK-HerA superfamily (Le Bourgeois et al., 2007). The C-terminal domain of FtsK^{SL} shows 41% similarity at the amino acid level in relation to FtsK_{*E. coli*} with four of the five amino acids similar (QR-GN motif) involved in XerD interaction (Keller et al., 2016). On the other hand, FtsK^{SL} is unable to read *E. coli* KOPS motifs as demonstrated by Nolivos et al. (2012), probably due to the lack of common skewed octamers sequences called Architecture Imparting Sequences (AIMS) in *Firmicutes*, which means that KOPS sequences in *Firmicutes* are not as conserved as in proteobacteria (Hendrickson and Lawrence, 2006). This would also explain the divergence between FtsK_{*γ*} domains even among *Firmicutes*. Additionally, AIMS found in *Lactococcus lactis* differ in both in length and in sequence from traditional KOPS/SRS motifs, being A-rich heptamer motifs instead of the GC-rich octamer motifs (Nolivos et al., 2012). XerS also lacks critical residues found in XerD to interact with FtsK (residues RQ-QQ). Interestingly, XerS/*difSL* recombination occurs almost in a similar fashion to that of *E. coli*. Both Xer systems require FtsK_N localization at the division septum and FtsK_C translocation to achieved Xer dimer resolution. Additionally, XerS/*difSL* proved to be functional in *E. coli*, despite the lack of homology in their FtsK proteins. Further analyses on FtsK-Xer interactions are required since the exact mode of action is still speculative (Nolivos et al., 2010).

The *Helicobacter* and *Campylobacter* (*difH*/XerH) Model

Studies in *Helicobacter* sp and *Campylobacter* sp led to the discovery of another type of single recombinase called XerH that acts on a recombination site called *difH* in a FtsK-dependent manner. It was shown to be involved in chromosome segregation and possibly dimer resolution in *Helicobacter pylori* (Debowski et al., 2012). XerH (354–362 aa) differs from the traditional XerCD (298 aa) recombinases by its size and protein homology (26% of identity with respect to XerCD). It also shows more similarity to XerS (356 aa) in both the size of the protein and the high degree of homology of their recombination sites (Carnoy and Roten, 2009; Leroux et al., 2013). Another characteristic of XerH and a possible hallmark of single recombinases (XerS and XerH) is that the *difH* sequence is also located near the recombinase-encoding gene, indicating a possible individual genetic module for Xer expression (Le Bourgeois et al., 2007; Carnoy and Roten, 2009). Interestingly, most of the epsilon species of ϵ -proteobacteria harbor a XerH/*difH* system whereas some other ϵ -proteobacteria (*Sulfurimonas denitrificans* and *Sulfurovum*) possess a system analogous to the classical XerCD system. Additionally, unlike other tyrosine Xer recombinases, XerH activity appears to be affected by a second Xer recombinase called XerT in *H. pylori* (the TnPZ transposon associated recombinase) since under XerT deletion, *difH* recombination levels increased (Debowski et al., 2012). Recent structural studies showed that the *Helicobacter difH* comprises two highly conserved imperfect inverted binding sites of 11 and 10 bp (AGTTATGAAAA and AAAAGTTTGA) in the left and right sides respectively, separated by a 6–10 bp central region (Figure 3J) (Bebel et al., 2016) (Unpublished data suggest a 10 bp central region, Leroux et al., 2013). Two subunits of XerH bind cooperatively to each side with a stronger binding affinity as well as cleavage reaction efficiency in the left half site than the right half site (the outer region in *dif* appears to be determinant in the order of binding and cleavage reactions). The left half site preference is due to stronger interaction between XerH and *difH* left site $\Delta G = -21.3$ kcal/mol compared to the right half site $\Delta G = -15.4$ kcal/mol). The extra nucleotide thymine (T4) in the outer region of the left half site confers a specific hydrogen bond between the left arm and the lysine (K290) of XerH that favors stronger protein–DNA interaction with the other three outermost nucleotides, DNA bending and specific positioning of the nucleophilic tyrosine. Surprisingly, XerH assembly on *difH* does not induce strong DNA bending alone and it seems to require FtsK to generate the required conformational rearrangements to favor XerH DNA exchange (Bebel et al., 2016). Results obtained by Leroux et al. (2013) in *difH* of *C. jejuni* (*difH_{camp}*) demonstrated that XerH binding to either the left or right site of *difH_{camp}* resulted in similar affinities compared to the full *difH_{camp}* site possibly due to the similarity between the outer sequences of both arms. Additionally, XerH binding to *difH_{camp}* appears to be less efficient than XerS which suggests that it is less cooperative than XerS/*difSL* system. Additionally, these results contradict XerH binding affinities observed in *H. pylori* by Bebel et al. (2016) and in most tyrosine recombinases involved in chromosome

resolution since it did not show any binding preference. On the other hand, unlike binding activity, asymmetrical cleavage reactions by XerH were found with a higher efficiency for bottom-strand substrates than top strand, in agreement with the results of Bebel et al. (2016) XerH recombination was also observed *in vivo* between two *difH_{camp}* sites located on the same plasmid; it is also suggested that XerH might be involved in decatenation processes because of the apparent absence of Topo IV proteins in *H. pylori* (Debowski et al., 2012; Leroux et al., 2013). Interestingly, despite *difH_{camp}* and *difSL* similarities in the recombination sites, the recombinases do not cross-react (XerH does not bind *difSL* and XerS does not bind *difH_{camp}* sites) (Leroux, unpublished).

The Archaea *dif*/XerA Model

In archaea, chromosome resolution appears to be catalyzed by a single recombinase (XerA) in a FtsK-independent manner that acts on a *dif*-like site located in the replication terminus region (Cortez et al., 2010; Serre et al., 2013). XerA shares a conserved C-terminal domain where the active tyrosine and the conserved catalytic residues (R-K-H-R-[H/W]-Y) reside. XerA proteins are well conserved between the archaeal species analyzed with 85% of sequence similarity. The *xerA* gene location is highly variable in archaea; some species exhibit separated *xerA/dif* sequences whereas some others harbor an individual *xerA/dif* module. Unlike most bacteria, the *dif*-like site is not normally located at 180° from *oriC* and conversely, it is located between 122° and 144° from *oriC* in the analyzed genomes, although the *Methanospaera stadtmannae* genome showed a *dif*-like site at 180° from *oriC*. *dif*-like sequences consist of the traditional structure; two inverted repeat sequences of 11 bp separated by a central region of 6 bp. XerA catalyzes cleavage reactions without any detectable strand preference (Cortez et al., 2010; Serre et al., 2013).

Although archaea do not require a FtsK homolog to perform chromosome resolution, KOPS-like motifs have been found in Archaea. These KOPS-like motifs consist of four nucleotides (GTTG OR GTTC) called ASPS (Archaea Short Polarized Sequences) that are skewed toward *dif* sites, showing a similar triangle-shaped diagram observed in Bacteria of skew inversion at *dif* sites (Cortez et al., 2010). Serre et al. (2013) have revealed the crystal structure of XerA proteins from *Pyrococcus abyssi*, and Hwa Jo et al. (2016) from *Thermoplasma acidophilum*. Both groups reinforced the idea of *cis*-cleavage reaction by XerA.

FUTURE DIRECTIONS

Much information has been gained on site specific recombinases and dimer resolution. This review has highlighted the complexity of *dif*/Xer recombinase systems in prokaryotes and its importance for genome stability and pathogenicity factors. However, many fundamental questions remain unanswered: how do SpoIIIE and SftA from *Bacillus* activate SSR? Moreover, what is the selective advantage of having two chromosome DNA translocases? Additionally, 12% of the

studied proteobacterial species do not possess the traditional Xer recombination machinery. Thus, it is still unknown whether these microorganisms lost the Xer recombination system, never acquired it or developed an alternative system to decatenate the chromosomes. It raises the question of how do bacterial cells handle chromosome decatenation without Xer recombinases and *dif*? Is there an alternative recombination system that functions as the *dif*/Xer system? Regarding single recombinases, have they evolved from XerC/XerD recombinases or vice versa, or did they arise from an ancestral recombinase? These and other issues already considered in this review are being gradually addressed by the use of the latest techniques in real-time imaging with super-resolution microscopy. Such as; photo-activated localization microscopy (PALM) and stochastic optical reconstruction microscopy (STORM), plus the use of other techniques as Förster (Fluorescence) resonance energy transfer (FRET), tethered fluorophore motion (TFM), single-molecule Fluorescence resonance energy transfer (smFRET), among others. They are providing a powerful blueprint for investigators studying short- and long-range changes in DNA, DNA/protein, and protein/protein interactions. Researchers in SSR systems and protein–protein interactions might be the most direct beneficiaries of these techniques, especially when it is becoming urgent to further understand IMEX insertion and

its subsequent influence in antibiotic resistance and bacterial virulence.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All the authors contributed equally to the work by providing: Substantial contributions to the conception or design of the work; the acquisition, analysis, and interpretation of data for the work; Drafting the work or revising it critically for important intellectual concepts; Final approval of the version to be published; and Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

FUNDING

The authors acknowledge funding from Discovery Grant 106085-2013 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. FC received salary support from the Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, and AB received salary support from the Tunisian Ministry of Higher Education.

REFERENCES

- Antonelli, A., D'Andrea, M. M., Di Pilato, V., Viaggi, B., Torricelli, F., and Rossolini, G. M. (2015). Characterization of a novel putative xer-dependent integrative mobile element carrying the *bla_{NMC-A}* carbapenemase gene, inserted into the chromosome of members of the *Enterobacter cloacae* complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 6620–6624. doi: 10.1128/AAC.01452-15
- Aussel, L., Barre, F. X., Aroyo, M., Stasiak, A., Stasiak, A. Z., and Sherratt, D. (2002). FtsK is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell* 108, 195–205. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00624-4
- Austin, S., Ziese, M., and Sternberg, N. (1981). A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* 25, 729–736. doi: 10.1016/0092-8674(81)90180-X
- Ayora, S., Carrasco, B., Cárdenas, P. P., César, C. E., Cañas, C., Yadav, T., et al. (2011). Double-strand break repair in bacteria: a view from *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 1055–1081. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00272.x
- Azeroglu, B., Mawer, J. S. P., Cockram, C. A., White, M. A., Hasan, A. M. M., Filatenkova, M., et al. (2016). RecG directs DNA synthesis during double-strand break repair. *PLoS Genet.* 12:e1005799. doi: 10.1371/journal.pgen.1005799
- Barre, F. X. (2007). FtsK and SpoIIIE: the tale of the conserved tails. *Mol. Microbiol.* 66, 1051–1055. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05981.x
- Barre, F. X., Soballe, B., Michel, B., Aroyo, M., Robertson, M., and Sherratt, D. (2001). Circles: the replication-recombination-chromosome segregation connection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 8189–8195. doi: 10.1073/pnas.111008998
- Bebel, A., Karaca, E., Kumar, B., and Stark, W. M. (2016). Structural snapshots of Xer recombination reveal activation by synaptic complex remodeling and DNA bending. *Elife* 5:e19706. doi: 10.7554/eLife.19706
- Berezuk, A. M., Goodyear, M., and Khursigara, C. M. (2014). Site-directed fluorescence labeling reveals a revised N-terminal membrane topology and functional periplasmic residues in the *Escherichia coli* cell division protein FtsK. *J. Biol. Chem.* 289, 23287–23301. doi: 10.1074/jbc.M114.569624
- Berza, I., Dishlers, A., Petrovskis, I., Tars, K., and Kazaks, A. (2013). Plasmid dimerization increases the production of hepatitis B core particles in *E. coli*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 18, 850–857. doi: 10.1007/s12257-013-0188-5
- Besprozvannaya, M., and Burton, B. M. (2014). Do the same traffic rules apply? Directional chromosome segregation by SpoIIIE and FtsK. *Mol. Microbiol.* 93, 599–608. doi: 10.1111/mmi.12708
- Besprozvannaya, M., Pivorunas, V. L., Feldman, Z., and Burton, B. M. (2013). SpoIIIE protein achieves directional DNA translocation through allosteric regulation of ATPase activity by an accessory domain. *J. Biol. Chem.* 288, 28962–28974. doi: 10.1074/jbc.M113.484055
- Bigot, S., Corre, J., Louarn, J. M., Cornet, F., and Barre, F. X. (2004). FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein. *Mol. Microbiol.* 54, 876–886. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04335.x
- Bigot, S., Sivanathan, V., Possoz, C., Barre, F. X., and Cornet, F. (2007). FtsK, a literate chromosome segregation machine. *Mol. Microbiol.* 64, 1434–1441. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05755.x
- Biller, S. J., and 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. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06893.x
- Bischerour, J., Spangenberg, C., and Barre, F.-X. (2012). Holliday junction affinity of the base excision repair factor Endo III contributes to cholera toxin phage integration. *EMBO J.* 31, 3757–3767. doi: 10.1038/emboj.2012.219
- Bisicchia, P., Steel, B., and Debla, M. H. M. (2013). The N-terminal membrane-spanning domain of the *Escherichia coli* DNA translocase FtsK hexamerizes at midcell. *MBio* 4:e00800-13. doi: 10.1128/mBio.00800-13
- Biswas, T., Aihara, H., Radman-Livaja, M., Filman, D., Landy, A., and Ellenberger, T. (2005). A structural basis for allosteric control of DNA recombination by lambda integrase. *Nature* 435, 1059–1066. doi: 10.1038/nature03657
- Blaby, I. K., and Summers, D. K. (2009). The role of FIS in the Rcd checkpoint and stable maintenance of plasmid ColE1. *Microbiology* 155, 2676–2682. doi: 10.1099/mic.0.029777-0
- Blakely, G., May, G., McCulloch, R., Arciszewska, L. K., Burke, M., Lovett, S. T., et al. (1993). Two related recombinases are required for site-specific recombination at *dif* and *cer* in *E. coli* K12. *Cell* 75, 351–361. doi: 10.1016/0092-8674(93)80076-q

- Bose, B., Reed, S. E., Besprozvannaya, M., and Burton, B. M. (2016). Missense mutations allow a sequence-blind mutant of spoIIIE to successfully translocate chromosomes during sporulation. *PLoS ONE* 11:e0148365. doi: 10.1371/journal.pone.0148365
- Brown, W. R. A., Lee, N. C. O., Xu, Z., and Smith, M. C. M. (2011). Serine recombinases as tools for genome engineering. *Methods* 53, 372–379. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.12.031
- Bruning, J. G., Howard, J. L., and McGlynn, P. (2015). Accessory replicative helicases and the replication of protein-bound DNA. *J. Mol. Biol.* 426, 3917–3928. doi: 10.1016/j.jmb.2014.10.001
- Burton, B. M., Marquis, K. A., Sullivan, N. L., Rapoport, T. A., and Rudner, D. Z. (2010). The ATPase SpoIIIE transports DNA across fused septal membranes during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Cell* 131, 1301–1312. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.009
- Carnoy, C., and Roten, C.-A. (2009). The *diff*/Xer recombination systems in proteobacteria. *PLoS ONE* 4:e6531. doi: 10.1371/journal.pone.0006531
- Carrasco, B., Cozar, M. C., Lurz, R., Alonso, J. C., and Ayora, S. (2004). Genetic recombination in *Bacillus subtilis* 168: contribution of holliday junction processing functions in chromosome segregation. *J. Bacteriol.* 186, 5557–5566. doi: 10.1128/JB.186.17.5557
- Cattoni, D. I., Thakur, S., Godefroy, C., Le Gall, A., Lai-Kee-Him, J., Milhiet, P. E., et al. (2014). Structure and DNA-binding properties of the *Bacillus subtilis* SpoIIIE DNA translocase revealed by single-molecule and electron microscopies. *Nucleic Acids Res.* 42, 2624–2636. doi: 10.1093/nar/gkt1231
- Chen, Y., Narendra, U., Iype, L. E., Cox, M. M., and Rice, P. A. (2000). Crystal structure of a Flp recombinase-Holliday junction complex: assembly of an active oligomer by helix swapping. *Mol. Cell* 6, 885–897. doi: 10.1016/S1097-2765(05)00088-2
- Chen, Z., Yang, H., and Pavletich, N. P. (2008). Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. *Nature* 453, 489–494. doi: 10.1038/nature06971
- Christie, P. J., Whitaker, N., and González-Rivera, C. (2014). Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 1578–1591. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.12.019
- Colloms, S. D. (2013). The topology of plasmid-monomerizing Xer site-specific recombination. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 589–594. doi: 10.1042/BST20120340
- Colloms, S. D., McCulloch, R., Grant, K., Neilson, L., and Sherratt, D. J. (1996). Xer-mediated site-specific recombination in vitro. *EMBO J.* 15, 1172–1181.
- Colloms, S. D., Sykora, P., Szatmari, G., and Sherratt, D. J. (1990). Recombination at ColE1 *cer* requires the *Escherichia coli* xerC gene product, a member of the lambda integrase family of site-specific recombinases. *J. Bacteriol.* 172, 6973–6980. doi: 10.1128/jb.172.12.6973-6980.1990
- Cornet, F., Hallet, B., and Sherratt, D. J. (1997). Xer recombination in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272, 21927–21931. doi: 10.1074/jbc.272.35.21927
- Cornet, F., Mortier, I., Patte, J., and 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 *diff*. *J. Bacteriol.* 176, 3188–3195. doi: 10.1128/jb.176.11.3188-3195.1994
- Cortez, D., Quevillon-Cheruel, S., Gribaldo, S., Desnoues, N., Sezonov, G., Forterre, P., et al. (2010). Evidence for a Xer/*diff* system for chromosome resolution in archaea. *PLoS Genet.* 6:e1001166. doi: 10.1371/journal.pgen.1001166
- Costes, A., and Lambert, S. (2012). Homologous recombination as a replication fork escort: fork-protection and recovery. *Biomolecules* 3, 39–71. doi: 10.3390/biom3010039
- Cox, M. M., Goodman, M. F., Kreuzer, K. N., Sherratt, D. J., Sandler, S. J., and Marians, K. J. (2000). The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* 404, 37–41. doi: 10.1038/35003501
- Cromie, G. A., and Leach, D. R. (2000). Control of crossing over. *Mol. Cell* 6, 815–826. doi: 10.1016/S1097-2765(05)00095-X
- Crozat, E., Fournes, F., Cornet, F., Hallet, B., and Rousseau, P. (2014). Resolution of multimeric forms of circular plasmids and chromosomes. *Microbiol. Spectr.* 2, 1–16. doi: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0025-2014.f1
- Crozat, E., and Grainge, I. (2010). FtsK DNA translocase: the fast motor that knows where it's going. *ChemBioChem* 11, 2232–2243. doi: 10.1002/cbic.201000347
- Darmon, E., Eykelenboom, J. K., Lopez-Vernaza, M. A., White, M. A., and Leach, D. R. F. (2014). Repair on the go: *E. Coli* maintains a high proliferation rate while repairing a chronic DNA double-strand break. *PLoS ONE* 9:e110784. doi: 10.1371/journal.pone.0110784
- Das, B. (2014). Mechanistic insights into filamentous phage integration in *Vibrio cholerae*. *Front. Microbiol.* 5:650. doi: 10.3389/fmicb.2014.00650
- Das, B., Martinez, E., Midonet, C., and Barre, F.-X. (2013). Integrative mobile elements exploiting Xer recombination. *Trends Microbiol.* 21, 23–30. doi: 10.1016/j.tim.2012.10.003
- Debowski, A. W., Carnoy, C., Verbrugghe, P., Nilsson, H.-O., Gauntlett, J. C., Furlurija, A., et al. (2012). Xer recombinase and genome integrity in *Helicobacter pylori*, a pathogen without topoisomerase IV. *PLoS ONE* 7:e33310. doi: 10.1371/journal.pone.0033310
- Demarre, G., Galli, E., and Barre, F.-X. (2013). “The FtsK family of DNA pumps.” in *DNA Helicases and DNA Motor Proteins: Advances in Experimental*, ed. M. Spies (New York, NY: Springer), 245–262. doi: 10.1007/978-1-4614-5037-5
- Demarre, G., Galli, E., Muresan, L., Paly, E., David, A., Possoz, C., et al. (2014). Differential management of the replication terminus regions of the two *Vibrio cholerae* chromosomes during cell division. *PLoS Genet.* 10:e1004557. doi: 10.1371/journal.pgen.1004557
- Dermić, D. (2015). Double-strand break repair mechanisms in *Escherichia coli*: recent insights. *Adv. Genomics Genet.* 5, 35–42. doi: 10.2147/AGG.S51699
- Diagne, C. T., Salhi, M., Crozat, E., Salomé, L., Cornet, F., Rousseau, P., et al. (2014). TPM analyses reveal that FtsK contributes both to the assembly and the activation of the XerCD-*diff* recombination synapse. *Nucleic Acids Res.* 42, 1721–1732. doi: 10.1093/nar/gkt1024
- Domínguez, N. M., Hackett, K. T., and Dillard, J. P. (2011). XerCD-mediated site-specific recombination leads to loss of the 57-kilobase gonococcal genetic Island. *J. Bacteriol.* 193, 377–388. doi: 10.1128/JB.00948-10
- Dubarry, N., Possoz, C., and Barre, F. X. (2010). Multiple regions along the *Escherichia coli* FtsK protein are implicated in cell division. *Mol. Microbiol.* 78, 1088–1100. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07412.x
- Elshenawy, M. M., Jergic, S., Xu, Z.-Q., Sobhy, M. A., Takahashi, M., Oakley, A. J., et al. (2015). Replisome speed determines the efficiency of the Tus-Ter replication termination barrier. *Nature* 525, 394–398. doi: 10.1038/nature14866
- Faruque, S. M., and Mekalanos, J. J. (2012). Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Virulence* 3, 556–565. doi: 10.4161/viru.22351
- Fiche, J. B., Cattoni, D. I., Diekmann, N., Langerak, J. M., Clerce, C., Royer, C. A., et al. (2013). Recruitment, assembly, and molecular architecture of the SpoIIIE DNA pump revealed by superresolution microscopy. *PLoS Biol.* 11:e1001557. doi: 10.1371/journal.pbio.1001557
- Field, C. M., and Summers, D. K. (2011). Multicopy plasmid stability: revisiting the dimer catastrophe. *J. Theor. Biol.* 291, 119–127. doi: 10.1016/j.jtbi.2011.09.006
- Fijalkowska, I. J., Schaaper, R. M., and Jonczyk, P. (2012). DNA replication fidelity in *Escherichia coli*: a multi-DNA polymerase affair. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 1105–1121. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00338.x
- Fournes, F., Crozat, E., Pages, C., Tardin, C., Salomé, L., Cornet, F., et al. (2016). FtsK translocation permits discrimination between an endogenous and an imported Xer/*diff* recombination complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 7882–7887. doi: 10.1073/pnas.1523178113
- Gopaul, D. N., and Van Duyne, G. D. (1999). Structure and mechanism in site-specific recombination. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 14–20. doi: 10.1016/S0959-440X(99)80003-7
- Gowrishankar, J. (2015). End of the beginning: elongation and termination features of alternative modes of chromosomal replication initiation in bacteria. *PLoS Genet.* 11:e1004909. doi: 10.1371/journal.pgen.1004909
- Graham, J. E., Sherratt, D. J., and Szczelkun, M. D. (2010). Sequence-specific assembly of FtsK hexamers establishes directional translocation on DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 20263–20268. doi: 10.1073/pnas.1007518107
- Graham, J. E., Sivanathan, V., Sherratt, D. J., and Arciszewska, L. K. (2009). FtsK translocation on DNA stops at XerCD-*diff*. *Nucleic Acids Res.* 38, 72–81. doi: 10.1093/nar/gkp843
- Grainge, I., Bregu, M., Vazquez, M., Sivanathan, V., Ip, S. C. Y., and Sherratt, D. J. (2007). Unlinking chromosome catenanes in vivo by site-specific recombination. *EMBO J.* 26, 4228–4238. doi: 10.1038/sj.emboj.7601849
- Grainge, I., Lesterlin, C., and Sherratt, D. J. (2011). Activation of XerCD-*diff* recombination by the FtsK DNA translocase. *Nucleic Acids Res.* 39, 5140–5148. doi: 10.1093/nar/gkr078

- Grindley, N. D. F., Whiteson, K. L., and Rice, P. A. (2006). Mechanisms of site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 567–605. doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073908
- Groothuizen, F. S., and Sixma, T. K. (2015). The conserved molecular machinery in DNA mismatch repair enzyme structures. *DNA Repair* 38, 14–23. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.11.012
- Hallet, B., Arciszewska, L. K., and Sherratt, D. J. (1999). Reciprocal control of catalysis by the tyrosine recombinases XerC and XerD: an enzymatic switch in site-specific recombination. *Mol. Cell* 4, 949–959. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80224-5
- Handa, N., Morimatsu, K., Lovett, S. T., and Kowalczykowski, S. C. (2009). Reconstitution of initial steps of dsDNA break repair by the RecF pathway of *E. coli*. *Genes Dev.* 23, 1234–1245. doi: 10.1101/gad.1780709
- Harrison, P. W., Lower, R. P. J., Kim, N. K. D., and Young, J. P. W. (2010). Introducing the bacterial “chromid”: not a chromosome, not a plasmid. *Trends Microbiol.* 18, 141–148. doi: 10.1016/j.tim.2009.12.010
- Hassan, F., Kamruzzaman, M., Mekalanos, J. J., and Faruque, S. M. (2010). Satellite phage TLC ϕ enables toxigenic conversion by CTX phage through *dif* site alteration. *Nature* 467, 982–985. doi: 10.1038/nature09469
- Heller, R. C., and Mariani, K. J. (2006). Replisome assembly and the direct restart of stalled replication forks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 932–943. doi: 10.1038/nrm2058
- Hendrickson, H., and Lawrence, J. G. (2006). Selection for chromosome architecture in bacteria. *J. Mol. Evol.* 62, 615–629. doi: 10.1007/s00239-005-0192-2
- Hickman, A. B., Waninger, S., Scocca, J. J., and 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. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80202-0
- Hirano, N., Muroi, T., Takahashi, H., and Haruki, M. (2011). Site-specific recombinases as tools for heterologous gene integration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92, 227–239. doi: 10.1007/s00253-011-3519-5
- Huber, K. E., and Waldor, M. K. (2002). Filamentous phage integration requires the host recombinases XerC and XerD. *Nature* 417, 656–659. doi: 10.1038/nature00782
- Hwa Jo, C., Kim, J., Han, A., Yong Park, S., Yeon Hwang, K., Hyun Nam, K., et al. (2016). Crystal structure of *Thermoplasma acidophilum* XerA recombinase shows large C-shape clamp conformation and cis-cleavage mode for nucleophilic tyrosine. *FEBS Lett.* 590, 848–856. doi: 10.1002/1873-3468.12109
- Jha, J. K., Baek, J. H., Venkova-Canova, T., and Chatteraj, D. K. (2012). Chromosome dynamics in multichromosome bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1819, 826–829. doi: 10.1016/j.bbagr.2012.01.012
- Jha, J. K., Ramachandran, R., and Chatteraj, D. K. (2016). Opening the strands of replication origins—still an open question. *Front. Mol. Biosci.* 3:62. doi: 10.3389/fmolb.2016.00062
- Johnston, C., Mortier-Barrière, L., Granadel, C., Polard, P., Martin, B., and Claverys, J. P. (2015). RecFOR is not required for pneumococcal transformation but together with XerS for resolution of chromosome dimers frequently formed in the process. *PLoS Genet.* 11:e1004934. doi: 10.1371/journal.pgen.1004934
- Kaimer, C., González-Pastor, J. E., and Graumann, P. L. (2009). SpoIIIE and a novel type of DNA translocase, SfaA, couple chromosome segregation with cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 74, 810–825. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06894.x
- Kaimer, C., and Graumann, P. L. (2011). Players between the worlds: multifunctional DNA translocases. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 719–725. doi: 10.1016/j.mib.2011.10.004
- Kaimer, C., Schenk, K., and Graumann, P. L. (2011). Two DNA translocases synergistically affect chromosome dimer resolution in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 193, 1334–1340. doi: 10.1128/JB.00918-10
- Keller, A. N., Xin, Y., Boer, S., Reinhardt, J., Baker, R., Arciszewska, L. K., et al. (2016). Activation of Xer-recombination at *dif*: structural basis of the FtsKY–XerD interaction. *Sci. Rep.* 6, 1–12. doi: 10.1038/srep33357
- Kirkup, B. C., Chang, L., Chang, S., Gevers, D., and Polz, M. F. (2010). *Vibrio* chromosomes share common history. *BMC Microbiol.* 10:137. doi: 10.1186/1471-2180-10-137
- Kisker, C., Kuper, J., and Van Houten, B. (2013). Prokaryotic nucleotide excision repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, 1–18. doi: 10.1101/cshperspect.a012591
- Kono, N., Arakawa, K., and Tomita, M. (2011). Comprehensive prediction of chromosome dimer resolution sites in bacterial genomes. *BMC Genomics* 12:19. doi: 10.1186/1471-2164-12-19
- Kuempel, P., Henson, J., Dircks, L., Tecklenburg, M., and Lim, D. (1991). *dif*, a recA-independent recombination site in the terminus region of the chromosome of *Escherichia coli*. *New Biol.* 3, 799–811.
- Kuzminov, A. (1999). Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 751–813.
- Kwon, H. J., Tirumalai, R., Landy, A., and Ellenberger, T. (1997). Flexibility in DNA recombination: structure of the lambda integrase catalytic core. *Science* 276, 126–131. doi: 10.1126/science.276.5309.126
- Labib, K., and Hodgson, B. (2007). Replication fork barriers: pausing for a break or stalling for time? *EMBO Rep.* 8, 346–353. doi: 10.1038/sj.embor.7400940
- Le Bourgeois, P., Bugarel, M., Campo, N., Daveran-Mingot, M.-L., Labonté, J., Lanfranchi, D., et al. (2007). The unconventional Xer recombination machinery of *Streptococci/Lactococci*. *PLoS Genet.* 3:e117. doi: 10.1371/journal.pgen.0030117
- Lee, J. Y., Finkelstein, I. J., Arciszewska, L. K., Sherratt, D. J., and Greene, E. C. (2014). Single-molecule imaging of FtsK translocation reveals mechanistic features of protein-protein collisions on DNA. *Mol. Cell* 54, 832–843. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.033
- Lee, J. Y., Finkelstein, I. J., Crozat, E., Sherratt, D. J., and Greene, E. C. (2012). Single-molecule imaging of DNA curtains reveals mechanisms of KOPS sequence targeting by the DNA translocase FtsK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 6531–6536. doi: 10.1073/pnas.1201613109
- Lenhart, J. S., Schroeder, J. W., Walsh, B. W., and Simmons, L. A. (2012). DNA repair and genome maintenance in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 530–564. doi: 10.1128/MMBR.05020-11
- Leroux, M., Jia, F., and Szatmari, G. (2011). Characterization of the *Streptococcus suis* XerS recombinase and its unconventional cleavage of the *dif*SL site. *FEMS Microbiol. Lett.* 324, 135–141. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02398.x
- Leroux, M., Rezoug, Z., and Szatmari, G. (2013). The Xer/dif site-specific recombination system of *Campylobacter jejuni*. *Mol. Genet. Genomics* 288, 495–502. doi: 10.1007/s00438-013-0765-5
- Lilley, D. M. J., and White, M. F. (2001). The junction-resolving enzymes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 433–443. doi: 10.1038/35073057
- Löwe, J., Ellonen, A., Allen, M. D., Atkinson, C., Sherratt, D. J., and Grainge, I. (2008). Molecular mechanism of sequence-directed DNA loading and translocation by FtsK. *Mol. Cell* 31, 498–509. doi: 10.1016/j.molcel.2008.05.027
- Martin, S. S., Pulido, E., Chu, V. C., Lechner, T. S., and 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. doi: 10.1016/S0022-2836(02)00246-2
- Martini, E., Diaz, R. L., Hunter, N., and Keeney, S. (2006). Crossover homeostasis in yeast meiosis. *Cell* 126, 285–295. doi: 10.1016/j.cell.2006.05.044
- Massey, T. H., Aussel, L., Barre, F.-X., and Sherratt, D. J. (2004). Asymmetric activation of Xer site-specific recombination by FtsK. *EMBO Rep.* 5, 399–404. doi: 10.1038/sj.embor.7400116
- Massey, T. H., Mercogliano, C. P., Yates, J., Sherratt, D. J., and Löwe, J. (2006). Double-stranded DNA translocation: structure and mechanism of hexameric FtsK. *Mol. Cell* 23, 457–469. doi: 10.1016/j.molcel.2006.06.019
- May, P. F. J., Zawadzki, P., Sherratt, D. J., Kapanidis, A. N., and Arciszewska, L. K. (2015). Assembly, translocation, and activation of XerCD-*dif* recombination by FtsK translocase analyzed in real-time by FRET and two-color tethered fluorophore motion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 5133–5141. doi: 10.1073/pnas.1510814112
- Mazin, A. V., Timchenko, T. V., Saparbaev, M. K., and Mazina, O. M. (1996). Dimerization of plasmid DNA accelerates selection for antibiotic resistance. *Mol. Microbiol.* 20, 101–108. doi: 10.1007/978-3-642-28951-4
- McLeod, S. M., and Waldor, M. K. (2004). Characterization of XerC- and XerD-dependent CTX phage integration in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 54, 935–947. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04309.x

- Meinke, G., Bohm, A., Hauber, J., Pisabarro, M. T., and Buchholz, F. (2016). Cre recombinase and other tyrosine recombinases. *Chem. Rev.* 116, 12785–12820. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00077
- Merrikh, H., Zhang, Y., Grossman, A. D., and Wang, J. D. (2012). Replication–transcription conflicts in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 449–458. doi: 10.1038/nrmicro2800
- Michel, B., Recchia, G. D., Penel-Colin, M., Ehrlich, S. D., and Sherratt, D. J. (2000). Resolution of Holliday junctions by RuvABC prevents dimer formation in rep mutants and UV-irradiated cells. *Mol. Microbiol.* 37, 180–191. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01989.x
- Midonet, C., and Barre, F.-X. (2016). How Xer-exploiting mobile elements overcome cellular control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 8343–8345. doi: 10.1073/pnas.1608539113
- Midonet, C., Das, B., Paly, E., and Barre, F.-X. (2014). XerD-mediated FtsK-independent integration of *TLCupphi* into the *Vibrio cholerae* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 16848–16853. doi: 10.1073/pnas.1404047111
- Million-Weaver, S., and Camps, M. (2014). Mechanisms of plasmid segregation: Have multicopy plasmids been overlooked? *Plasmid* 75, 27–36. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Nolivos, S., Pages, C., Rousseau, P., Le Bourgeois, P., and Cornet, F. (2010). Are two better than one? Analysis of an FtsK/Xer recombination system that uses a single recombinase. *Nucleic Acids Res.* 38, 6477–6489. doi: 10.1093/nar/gkq507
- Nolivos, S., Touzain, F., Pages, C., Coddeville, M., Rousseau, P., El Karoui, M., et al. (2012). Co-evolution of segregation guide DNA motifs and the FtsK translocase in bacteria: identification of the atypical *Lactococcus lactis* KOPS motif. *Nucleic Acids Res.* 40, 5535–5545. doi: 10.1093/nar/gks171
- Pages, V. (2016). Single-strand gap repair involves both RecF and RecBCD pathways. *Curr. Genet.* 62, 519–521. doi: 10.1007/s00294-016-0575-5
- Pandey, M., Elshenawy, M. M., Jergic, S., Takahashi, M., Dixon, N. E., Hamdan, S. M., et al. (2015). Two mechanisms coordinate replication termination by the *Escherichia coli* Tus–Ter complex. *Nucleic Acids Res.* 43, 5924–5935. doi: 10.1093/nar/gkv527
- Pérols, K., Cornet, F., Merlet, Y., Delon, I., and Louarn, J. M. (2000). Functional polarization of the *Escherichia coli* chromosome terminus: the *dif* site acts in chromosome dimer resolution only when located between long stretches of opposite polarity. *Mol. Microbiol.* 36, 33–43. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01847.x
- Pomerantz, R. T., and O'Donnell, M. (2010). What happens when replication and transcription complexes collide? *Cell Cycle* 9, 2537–2543. doi: 10.4161/cc.9.13.12122
- Rajeev, L., Malanowska, K., and Gardner, J. F. (2009). Challenging a paradigm: the role of DNA homology in tyrosine recombinase reactions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 300–309. doi: 10.1128/MMBR.00038-08
- Recchia, G. D., Aroyo, M., Wolf, D., Blakely, G., and Sherratt, D. J. (1999). FtsK-dependent and -independent pathways of Xer site-specific recombination. *EMBO J.* 18, 5724–5734. doi: 10.1093/emboj/18.20.5724
- Recchia, G. D., and Sherratt, D. J. (1999). Conservation of xer site specific recombination genes in bacteria. *Mol. Microbiol.* 34, 1146–1148. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01668.x
- Reijns, M., Lu, Y., Leach, S., and Colloms, S. D. (2005). Mutagenesis of PepA suggests a new model for the Xer/ter synaptic complex. *Mol. Microbiol.* 57, 927–941. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04716.x
- Reyes-Lamothe, R., Nicolas, E., and Sherratt, D. J. (2012). Chromosome replication and segregation in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 46, 121–143. doi: 10.1146/annurev-genet-110711-155421
- Rocha, E. P. C., Cornet, E., and Michel, B. (2005). Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems. *PLoS Genet.* 1:e15. doi: 10.1371/journal.pgen.0010015
- Roghani, M., Zenkin, N., and Yuzenkova, Y. (2015). Bacterial global regulators DksA/ppGpp increase fidelity of transcription. *Nucleic Acids Res.* 43, 1529–1536. doi: 10.1093/nar/gkv003
- Saleh, O. A., Bigot, S., Barre, F.-X., and Allemand, J.-F. (2005). Analysis of DNA supercoil induction by FtsK indicates translocation without groove-tracking. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 436–440. doi: 10.1038/nsmb926
- Sciochetti, S. A., Piggot, P. J., and Garry, W. (2001). Identification and Characterization of the *dif* Site from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 183, 1058–1068. doi: 10.1128/JB.183.3.1058
- Sciochetti, S. A., Piggot, P. J., Sherratt, D. J., and Blakely, G. (1999). The ripX locus of *Bacillus subtilis* encodes a site-specific recombinase involved in proper chromosome partitioning. *J. Bacteriol.* 181, 6053–6062.
- Sénéchal, H., Delesques, J., and Szatmari, G. (2010). *Escherichia coli* ArgR mutants defective in *cer*/Xer recombination, but not in DNA binding. *FEMS Microbiol. Lett.* 305, 162–169. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.01921.x
- Sengupta, M., and Austin, S. (2011). Prevalence and significance of plasmid maintenance functions in the virulence plasmids of pathogenic bacteria. *Infect. Immun.* 79, 2502–2509. doi: 10.1128/IAI.00127-11
- Serre, M. C., El Arnaout, T., Brooks, M. A., Durand, D., Lisboa, J., Lazar, N., et al. (2013). The carboxy-terminal α N helix of the archaeal XerA tyrosine recombinase is a molecular switch to control site-specific recombination. *PLoS ONE* 8:e63010. doi: 10.1371/journal.pone.0063010
- Sherratt, D. J., Arciszewska, L. K., Blakely, G., Colloms, S., Grant, K., Leslie, N., et al. (1995). Site-specific recombination and circular chromosome segregation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 347, 37–42. doi: 10.1098/rstb.1995.0006
- Sherratt, D. J., Søballe, B., Barre, F.-X., Filipe, S., Lau, I., Massey, T., et al. (2004). Recombination and chromosome segregation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 359, 61–69. doi: 10.1098/rstb.2003.1365
- Sivanathan, V., Allen, M. D., de Bekker, C., Baker, R., Arciszewska, L. K., Freund, S. M., et al. (2006). The FtsK γ domain directs oriented DNA translocation by interacting with KOPS. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 965–972. doi: 10.1038/nsmb1158
- Spies, M., and Kowalczykowski, S. C. (2005). “RecBCD and RecF Pathways,” in *The Bacterial Chromosome*, ed. N. Patrick Higgins (Washington, DC: ASM press), 389–403. doi: 10.1128/9781555817640.ch21
- Steiner, W., Liu, G., Donachie, W. D., and Kuempel, P. (1999). The cytoplasmic domain of FtsK protein is required for resolution of chromosome dimers. *Mol. Microbiol.* 31, 579–583. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01198.x
- Steiner, W. W., and Kuempel, P. L. (1998). Sister chromatid exchange frequencies in *Escherichia coli* analyzed by recombination at the *dif* resolvase site. *J. Bacteriol.* 180, 6269–6275.
- Stirling, C. J., Colloms, S. D., Collins, J. F., Szatmari, G., and Sherratt, D. J. (1989). *xerB*, an *Escherichia coli* gene required for plasmid ColE1 site-specific recombination, is identical to *pepA*, encoding aminopeptidase A, a protein with substantial similarity to bovine lens leucine aminopeptidase. *EMBO J.* 8, 1623–1627.
- Stirling, C. J., Stewart, G., and Sherratt, D. J. (1988a). Multicopy plasmid stability in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 214, 80–84. doi: 10.1007/BF00340183
- Stirling, C. J., Szatmari, G., Stewart, G., Smith, M. C. M., and Sherratt, D. J. (1988b). The arginine repressor is essential for plasmid-stabilizing site-specific recombination at the ColE1 *cer* locus. *EMBO J.* 7, 4389–4395.
- Subramanya, H. S., Arciszewska, L. K., Baker, R. A., Bird, L. E., Sherratt, D. J., and Wigley, D. B. (1997). Crystal structure of the site-specific recombinase, XerD. *EMBO J.* 16, 5178–5187. doi: 10.1093/emboj/16.17.5178
- Summers, D. K., Beton, C. W., and Withers, H. L. (1993). Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis. *Mol. Microbiol.* 8, 1031–1038. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01648.x
- Summers, D. K., and Sherratt, D. J. (1984). Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell* 36, 1097–1103. doi: 10.1016/0092-8674(84)90060-6
- Swalla, B. M., Gumport, R. I., and Gardner, J. F. (2003). Conservation of structure and function among tyrosine recombinases: homology-based modeling of the lambda integrase core-binding domain. *Nucleic Acids Res.* 31, 805–818. doi: 10.1093/nar/gkg142
- Tehranchi, A. K., Blankschien, M. D., Zhang, Y., Halliday, J., Peng, J., Herman, C., et al. (2010). The transcription factor DksA prevents disruption of DNA replication upon nutritional stress. *Cell* 141, 595–605. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.036
- Val, M. E., Bouvier, M., Campos, J., Sherratt, D., Cornet, F., Mazel, D., et al. (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. doi: 10.1016/j.molcel.2005.07.002
- Val, M.-E., Kennedy, S. P., El Karoui, M., Bonné, L., Chevalier, F., and Barre, F.-X. (2008). FtsK-dependent dimer resolution on multiple chromosomes in the

- pathogen *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet.* 4:e1000201. doi: 10.1371/journal.pgen.1000201
- Val, M.-E., Marbouty, M., de Lemos Martins, F., Kennedy, S. P., Kemble, H., Bland, M. J., et al. (2016). A checkpoint control orchestrates the replication of the two chromosomes of *Vibrio cholerae*. *Sci. Adv.* 2, 1–14. doi: 10.1126/sciadv.1501914
- van der Veen, S., and Tang, C. M. (2015). The BER necessities: the repair of DNA damage in human-adapted bacterial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 83–94. doi: 10.1038/nrmicro3391
- Van Gool, A. J., Hajibagheri, N. M. A., Stasiak, A., and West, S. C. (1999). Assembly of the *Escherichia coli* RuvABC resolvosome directs the orientation of Holliday junction resolution. *Genes Dev.* 13, 1861–1870. doi: 10.1101/gad.13.14.1861
- Vanhooff, V., Normand, C., Galloy, C., Segall, A. M., and Hallet, B. (2009). Control of directionality in the DNA strand-exchange reaction catalysed by the tyrosine recombinase TnpI. *Nucleic Acids Res.* 38, 2044–2056. doi: 10.1093/nar/gkp1187
- Veiga, H., and Pinho, M. (2016). *Staphylococcus aureus* requires at least one FtsK/SpoIIIE protein for correct chromosome segregation. *Mol. Microbiol.* 103, 504–517. doi: 10.1111/mmi.13572
- Vos, M., and Didelot, X. (2009). A comparison of homologous recombination rates in bacteria and archaea. *ISME J.* 3, 199–208. doi: 10.1038/ismej.2008.93
- Wang, X., Llopis, P. M., and Rudner, D. Z. (2013). Organization and segregation of bacterial chromosomes. *Nat. Rev. Genet.* 14, 1–22. doi: 10.1038/nrg3375
- Warren, D., Laxmikanthan, G., and Landy, A. (2013). Integrase family of site-specific recombinases. *Brenners Encycl. Genet.* 4, 100–105. doi: 10.1016/B978-0-12-374984-0.01520-5
- Wu, H., Zhang, Z., Hu, S., and Yu, J. (2012). On the molecular mechanism of GC content variation among eubacterial genomes. *Biol. Direct* 7:2. doi: 10.1186/1745-6150-7-2
- Wu, L. J. (2009). It takes two DNA translocases to untangle chromosomes from the division septum. *Mol. Microbiol.* 74, 773–776. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06892.x
- Xu, Q., Dziejman, M., and Mekalanos, J. J. (2003). Determination of the transcriptome of *Vibrio cholerae* during intrainestinal growth and midexponential phase in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 1286–1291. doi: 10.1073/pnas.0337479100
- Yates, J., Aroyo, M., Sherratt, D. J., and Barre, F.-X. (2003). Species specificity in the activation of Xer recombination at *dif* by FtsK. *Mol. Microbiol.* 49, 241–249. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03574.x
- Yeeles, J. T. P., and Dillingham, M. S. (2010). The processing of double-stranded DNA breaks for recombinational repair by helicase-nuclease complexes. *DNA Repair* 9, 276–285. doi: 10.1016/j.dnarep.2009.12.016
- Yeeles, J. T. P., Poli, J., Marians, K. J., and Pasero, P. (2013). Rescuing stalled or damaged replication forks. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, 1–16. doi: 10.1101/cshperspect.a012815
- Yen Shin, J., Lopez-Garrido, J., Lee, S.-H., Diaz-Celis, C., Fleming, T., Bustamante, C., et al. (2015). Visualization and functional dissection of coaxial paired SpoIIIE channels across the sporulation septum. *Elife* 4, 1–24. doi: 10.7554/eLife.06474
- Yu, X. C., Weihe, E. K., and Margolin, W. (1998). Role of the C terminus of FtsK in *Escherichia coli* chromosome segregation. *J. Bacteriol.* 180, 6424–6428.
- Zawadzki, P., May, P. F. J., Baker, R. A., Pinkney, J. N. M., Kapanidis, A. N., and Sherratt, D. J. (2013). Conformational transitions during FtsK translocase activation of individual XerCD-*dif* recombination complexes. *PNAS* 110, 17302–17307. doi: 10.1073/pnas.1311065110
- Zhang, J., Mahdi, A. A., Briggs, G. S., and Lloyd, R. G. (2010). Promoting and avoiding recombination: contrasting activities of the *Escherichia coli* RuvABC Holliday junction resolvase and RecG DNA translocase. *Genetics* 185, 23–37. doi: 10.1534/genetics.110.114413

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Castillo, Benmohamed and Szatmari. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

