

Université de Montréal

Rôle de la topoisomérase I dans l'expression génique  
Chez *Escherichia coli*

Par

Imad Baaklini

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de  
Maître ès science (M.Sc)  
En microbiologie et immunologie

Juillet 2003

©Imad Baaklini, 2003



W

4

U58

2004

v. 095

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Rôle de la topoisomérase I dans l'expression génique  
Chez *Escherichia coli*

Présenté par  
Imad Baaklini

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr Marc Drolet  
Dr Patrick Hallenbeck  
Dr George Szatmari

Mémoire accepté le : .....

## 1 SOMMAIRE

### 1.1 En Français

De nombreuses études ont démontré le rôle de la topoisomérase I dans la régulation du surenroulement de l'ADN. Maintenu autour d'une moyenne favorable aux fonctions de l'ADN, le surenroulement est contrôlé par la gyrase qui introduit du surenroulement négatif, et la topoisomérase I qui le relaxe. Le modèle du « twin-supercoiled domain » démontré par plusieurs, révèle que la transcription génère des variations locales et transitoires du surenroulement, et implique la présence de la topoisomérase I et de la gyrase. Grâce à des souches *topA*<sup>-</sup>, l'implication de la topoisomérase I dans la transcription a été étudiée plus en détail. L'absence de la topoisomérase I dans la cellule c'est avérée être nuisible pour la croissance, à moins que la RNase H, une enzyme qui dégrade la partie ARN d'un hybride ARN-ADN, ne soit surproduite. Il a été proposé que le rôle de la topoisomérase I est de prévenir la formation d'hybride ADN-ARN durant la transcription, en relaxant le surenroulement négatif généré par la transcription. Dans ce travail, il est montré que la formation de R-loops inhibe la transcription, ce qui explique l'inhibition de la synthèse protéique dans le mutant *topA*<sup>-</sup>, et explique le rôle de la topoisomérase I durant la transcription.

**Mots clés :** Topoisomérase I, R-loops, RNase H, Transcription, Surenroulement de l'ADN

## 1.2 En Anglais

Many Studies have shown the participation of topoisomerase I in the regulation of DNA supercoiling. Gyrase, which introduces negative supercoils and topoisomerase I, which relaxes them, both contribute to maintaining DNA supercoiling at an average level which is favorable for cellular DNA functions. The “twin-supercoiled domain” model stipulates that transcription can generate high levels of transient supercoiling which are subsequently eliminated by topoisomerase I and gyrase. The use of *topA* null mutants has allowed us to evaluate the role of topoisomerase I in transcription. The absence of topoisomerase I is detrimental to cell growth and the overproduction of RNase H, an enzyme which degrades the RNA portion of a DNA-RNA hybrid, can correct these growth problems. It has been suggested that the cellular function of topoisomerase I is to prevent R-loop formation during transcription. This work shows that R-loop formation can impair transcription which explains why protein synthesis is inhibited in *topA* null mutants, and further supports the role of topoisomerase I in transcription.

**Key words:** Topoisomerase I, R-loops, RNase H, Transcription, DNA supercoiling

	V
<b>1 SOMMAIRE</b>	<b>III</b>
<b>1.1 En Français</b>	<b>III</b>
<b>1.2 En Anglais</b>	<b>IV</b>
<b>2 TABLE DES MATIÈRES</b>	<b>V</b>
<b>3 LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES</b>	<b>VII</b>
<b>4 LISTE DES ABRÉVIATIONS</b>	<b>VIII</b>
<b>5 INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>5.1 Le surenroulement de l'ADN</b>	<b>1</b>
5.1.1 La topologie de l'ADN chez les microorganismes	1
5.1.2 Les topoisomérases	2
5.1.3 Les topoisomérases de type IA	2
5.1.3.1 La topoisomérase I	3
5.1.3.2 La topoisomérase III	4
5.1.4 Les topoisomérases de type IIA	4
5.1.4.1 La gyrase	5
5.1.4.2 La topoisomérase IV	5
5.1.5 Le surenroulement global	6
5.1.6 Le surenroulement local	6
<b>5.2 La transcription</b>	<b>7</b>
5.2.1 La structure générale et la fonction de l'ARN polymérase	7
5.2.2 L'initiation de la transcription	8
5.2.2.1 La formation du complexe fermé	8
5.2.2.2 La formation du complexe ouvert	8
5.2.3 L'élongation de la transcription	10
5.2.4 La structure du complexe d'élongation	11
5.2.5 Les facteurs intrinsèques qui influence l'élongation	12
5.2.5.1 L'hybride ARN-ADN	12
5.2.5.2 L'interaction de l'ARN polymérase avec l'ARN et l'ADN	13
5.2.6 Les pauses, les arrêts et la terminaison	13
5.2.7 La stabilité de l'ARN	16
<b>5.3 Le surenroulement et la transcription</b>	<b>16</b>
5.3.1 Le surenroulement global et la transcription	17
5.3.2 Le surenroulement local et la transcription	17
5.3.3 Les mutations associées à la transcription	21

5.3.4	La recombinaison associée à la transcription	21
5.3.5	L'hypersurenroulement et la formation des R-loops	22
5.3.6	Rôle de la topoisomérase I durant l'élongation de la transcription	23
<b>5.4</b>	<b>Les R-loops et leurs conséquences sur les fonctions de l'ADN</b>	<b>25</b>
5.4.1	Initiation de la réplication	25
5.4.2	Recombinaison	26
5.4.3	Élongation de la transcription	26
<b>5.5</b>	<b>Le surenroulement et la réponse aux stress</b>	<b>27</b>
<b>5.6</b>	<b>La topoisomérase I dans la réponse aux stress</b>	<b>28</b>
<b>6</b>	<b>ARTICLE</b>	<b>30</b>
6.1	Summary	32
6.2	Introduction	33
6.3	Results	35
6.4	Discussion	57
6.5	Materials and methods	61
6.6	Acknowledgements	64
6.7	References	65
<b>7</b>	<b>DISCUSSION</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>98</b>



### 3 LISTE DES FIGURES

#### INTRODUCTION

Figure 1 : Structure de l'ARN polymérase en phase d'élongation de la transcription.	15
Figure 2 : Modèle de « twin-supercoiled domain ».	19

#### ARTICLE

Table 1: <i>Escherichia coli</i> strains used in this study.	37
Figure 1: The effect of gyrase reactivation by a temperature downshift on the growth and $\beta$ -galactosidase activity of a <i>topA</i> null mutant.	38
Figure 2: The effect of gyrase reactivation by a temperature downshift on the DNA synthesis rate in a <i>topA</i> null mutant.	39
Figure 3: The effect of gyrase reactivation by a temperature downshift on the ability of the <i>topA</i> null mutant to induce RelA-dependent ppGpp synthesis.	40
Figure 4: Primer extension analysis to measure <i>lac</i> expression in a <i>topA</i> null mutant following a temperature downshift to reactivate gyrase.	43
Figure 5: Northern blot analysis in polyacrylamide gels to detect shorter than full-length <i>lac</i> mRNA chains in a <i>topA</i> null mutant following a temperature downshift to reactivate gyrase.	44

- Figure 6: *crp* expression in a *topA* null mutant following a temperature downshift to reactivate gyrase 49
- Figure 7: Northern blot analysis in a polyacrylamide gel to detect shorter than full-length *crp* mRNA chains initiated from the P1 promoter in a *topA* null mutant following a temperature downshift to reactivate gyrase. 50
- Figure 8: *fis* expression in a *topA* null mutant following a temperature downshift to reactivate gyrase. 51
- Figure 9: Northern blot analysis in polyacrylamide gels to detect shorter than full-length *fis* mRNA chains in a *topA* null mutant following a temperature downshift to reactivate gyrase. 52
- Figure 10: Effects of the translation inhibitor spectinomycin on *crp* P1 mRNA accumulation in a *topA* null mutant following a temperature downshift to reactivate gyrase. 55
- Figure 11: Effects of the translation inhibitor spectinomycin on ORF1-*fis* mRNA accumulation in a *topA* null mutant following a temperature downshift to reactivate gyrase. 56

#### 4 LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléotide

ARN : acide ribonucléotide

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomal

ATP: adenosine triphosphate

ppGpp: guanosine tetraphosphate

ORF: cadre de lecture ouvert (open reading frame)

Tn: transposon

Lk: nombre de fois que les deux brins d'ADN se croisent

TCA: acide trichloroacétique

WT : souches bactériennes de type sauvage (Wild type)

## 5 INTRODUCTION

### 5.1 Le surenroulement de l'ADN

#### 5.1.1 La topologie de l'ADN chez les microorganismes

L'ADN des organismes mésophiles est surenroulé négativement (Charbonnier et Forterre, 1994) avec un Lk qui varie entre  $-0,07$  et  $-0,05$ . Cet état négativement surenroulé de l'ADN, est essentiellement dû à l'activité antagoniste de la topoisomérase I qui relaxe le surenroulement négatif et de la gyrase qui introduit du surenroulement négatif (Drilca, 1992, Wang, 1996). D'un autre côté, les archéobactéries hyperthermophiles possèdent un chromosome surenroulé positivement (Charbonnier et Forterre, 1994; Lopez-Garcia et Forterre, 1997) avec un Lk qui varie entre  $-0,006$  et  $+0,03$ . Cet état de surenroulement positif implique la présence d'une enzyme, la reverse gyrase (Lopez-Garcia, 1999) qui introduit du surenroulement positif pour prévenir la dénaturation de l'ADN à haute température (Forterre et *al.*, 1996; Guipaud et *al.*, 1997).

Le surenroulement est la structure géométrique que peut adopter l'ADN dans l'espace. Il est défini par trois paramètres exprimés dans l'équation suivante:  $Lk = Tw + Wr$ . Le Lk est égal au nombre de fois que les deux brins se croisent et correspond à une constante lorsque les bouts de l'ADN sont liés de manière covalente. Le Lk se décompose en deux valeurs géométriques le Tw et le Wr. Le Tw représente la torsion d'un brin autour de l'autre et est directement lié au pas de l'hélice, alors que le Wr correspond à l'enroulement de la double hélice autour de son axe central. Pour un ADN circulaire, tout changement dans le Tw ou le Wr affecte la géométrie de l'ADN.

Par convention, la double hélice qui tourne vers la droite (ADN de type B) est définie comme positive. Le surenroulement négatif correspond alors à une diminution du nombre de Lk comparé à un état antécédent Lk<sub>0</sub>. Puisque le nombre de Lk (nombre de fois que les deux brins se croisent) ne peut varier pour un plasmide circulaire (torsion autour de son axe principal) et dans le Tw (torsion d'un brin autour de l'autre). Dans cette situation,

l'ADN adopte une forme compacte avec des régions où les deux brins sont plus ou moins séparés (Cozzarelli et al., 1990).

### 5.1.2 Les topoisomérases

Les topoisomérases sont les outils dont la cellule dispose pour gérer les variations topologiques au niveau de l'ADN. Elles modifient le nombre de Lk en coupant l'ADN aux endroits où les deux brins se rejoignent. En faisant passer le brin d'ADN intact à travers la coupure créée sur le brin opposé (topoisomérase I) ou en faisant passer simultanément les deux brins opposés à travers le trou créé par la coupure des deux brins à la fois (topoisomérase II), les topoisomérases déjouent les tensions au niveau de l'ADN générées par la réplication, la transcription et la recombinaison (Champoux, 2001). De part sa structure en double hélice, toutes les protéines cellulaires qui ont une activité au niveau de l'ADN peuvent y induire des tensions. Pour empêcher que ces tensions ne s'accumulent et soient dommageables aux fonctions de l'ADN, le niveau du surenroulement est maintenu constant autour d'une moyenne, grâce à l'activité des topoisomérases (Drlica, 1992). Ces enzymes sont alors impliquées dans la plupart des fonctions de l'ADN, ce qui font d'elles des enzymes clés pour la cellule. Parmi les quatre topoisomérases découvertes chez *E.coli*, les topoisomérases I et III sont de type IA, tandis que la gyrase et la topoisomérase IV sont de type IIA.

### 5.1.3 Les topoisomérases de type IA

Les topoisomérases de type IA ont la particularité de couper un brin d'ADN à la fois, tout en s'y attachant de manière covalente par une liaison phosphodiester en 5' (les topoisomérases de type IB s'attachent en 3'. Wang, 1996). Protéines monomériques, elles reconnaissent comme substrat une région exposée d'ADN simple brin, proche d'une région d'ADN double brin (Kikegaard et Wang, 1985), structure formée par le surenroulement négatif. De ce fait, leur fonction est de relaxer les supertours négatifs. Pour toute activité de relaxation, ces enzymes ne consomment pas d'énergie (ATP), mais ont besoin de  $Mg^{2+}$  pour leur activité catalytique (Champoux, 2001; Wang, 1996).

### 5.1.3.1 La topoisomérase I

La topoisomérase I (Wang, 1971) est codée par le gène *topA* (Trucksis et Depew, 1981). Sa structure est semblable à une pince au centre de laquelle une ouverture chargée positivement peut accommoder facilement les deux brins d'ADN. L'oxygène de la tyrosine du site actif se lie de façon covalente au phosphate de l'ADN et clive en 5' de préférence après une suite de cytosines. Tout en tenant chaque côté de l'ouverture créée par les bouts du brin coupé, l'enzyme fait passer dans l'ouverture le brin non coupé, puis relie ensuite les deux bouts du brin coupé. Le résultat de cette manœuvre est le changement du Lk de + 1 tour (Wang, 1996).

En absence de topoisomérase I fonctionnelle, les cellules ont une phase de latence très longue et sont sensibles aux « shifts-up » nutritionnels (Drolet et *al.*, 1995). Elles ont tendance à accumuler des mutations compensatoires dans les gènes *gyrA* ou *gyrB* (DiNardo et *al.*, 1982), qui diminuent le niveau de surenroulement en dessous de celui d'une souche sauvage (Pruss et *al.*, 1982; Hammond et *al.*, 1991). Des duplications des gènes *parC* et *parE* qui codent pour deux sous-unités de la topoisomérase IV, peuvent également rendre l'absence de topoisomérase I plus tolérable pour la cellule (Kato et *al.*, 1988; Kato et *al.*, 1990). La formation de R-loops, hybrides formés par l'ARN synthétisé et l'ADN simple brin, est favorisée par un excès de surenroulement négatif dans les mutants *topA* généré lors de la transcription, et corrèle avec l'inhibition de la croissance (Massé et Drolet, 1999). En accord avec ces observations, la surproduction de la RNase H (enzyme qui dégrade la partie ARN d'un hybride ARN-ADN) corrige des défauts de transcription au niveau des opérons ribosomiaux (Hraiky et *al.*, 2000) et complémente la croissance des mutants *topA*- (Drolet *al.*, 1995). Il a été proposé que le rôle de la topoisomérase I est de prévenir la formation de R-loops, en relaxant le surenroulement négatif produit lors de la transcription (Brill et Sternglanz, 1988; Shultz et *al.*, 1992). Des mutants *topA* sont également très sensibles aux stress (Rui et Tse-Dinh, 2003). Cette sensibilité aux stress est également corrigée par la surproduction de la RNase H (Cheng et *al.*, 2003).

### 5.1.3.2 La topoisomérase III

La topoisomérase III est codée par le gène *topB* (Digate et Mariani, 1988, 1989) et possède une structure homologue à celle de la topoisomérase I, avec en moins le domaine Zn (II) (Champoux, 2001; Wang, 1996). Elle est capable de relaxer les supertours négatifs à 52°C mais pas à 37°C. Ceci s'explique par un besoin accru de régions simples brins pour la relaxation. Elle possède également une activité de décaténation des duplexes ADN issue de la réplication (Champoux, 2001) ainsi qu'une activité de clivage et de décaténation de l'ARN (Digate et Mariani, 1992), ce qui la différencie de la topoisomérase I.

Des mutants de topoisomérase III sont viables chez *E.coli*. Comme c'est le cas chez certains organismes qui n'en possèdent pas (par exemple, *Campylobacter jejuni*, *Deinococcus radiodurans*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Treponema pallidum*), la fonction de cette enzyme peut être remplacée par la topoisomérase IV (Digate et Mariani, 1988). Récemment, la complémentation d'un mutant *topA* de *E.coli* par la surproduction de la topoisomérase III (Broccoli et al., 2000), ainsi que des expériences *in vitro* (Phoenix et al., 1997), suggèrent que la topoisomérase I pourrait déplacer l'ARN un hybride ARN-ADN grâce à sa fonction de relaxation de l'ADN.

### 5.1.4 Les topoisomérases de type IIA

Les topoisomérases de type IIA sont des enzymes dimériques qui clivent deux brins d'ADN à la fois. Le clivage qui crée une ouverture, est accompagné par un lien phosphodiester en 5' et un changement de conformation de l'enzyme. Le changement de conformation permet de tirer l'un des deux brins, et par la suite l'autre brin, à travers l'ouverture avant que l'enzyme ne procède à une ligation. Cette gymnastique aboutit à l'ajout de deux tours positifs  $Lk = +2$ , qui se traduisent par un changement dans le  $Wr$  et le  $Tw$ . Cette réaction consomme de l'énergie sous forme d'une molécule d'ATP et

nécessite comme co-facteur l'ion  $Mg^{2+}$  (Wang, 1996). Les topoisomérases IIB se différencient du type IIA par leur structure (Champoux, 2001).

#### 5.1.4.1 La gyrase

Cette enzyme est composée de deux sous unités GyrA et GyrB codées respectivement par *gyrA* et *gyrB*. GyrA qui lie, l'ADN est responsable de la liaison, de la coupure des brins d'ADN ainsi que de la ligation. En absence de la partie C-terminale de la sous-unités A, la gyrase n'est plus capable d'introduire du surenroulement négatif, mais plutôt relaxe l'ADN en présence d'ATP (Kampranis et Maxwell, 1996). Quant à la sous unité GyrB, elle est responsable de l'hydrolyse de l'ATP (Wang, 1996).

Cette enzyme reconnaît comme substrat une région double brin ADN de tours positifs (Wang, 1996). Elle relaxe les tensions générées au niveau de l'ADN par la progression de la fourche de réplication et par l'ARN polymérase durant l'élongation de la transcription (Figuroa et Bossi, 1988). Sa fonction dans la cellule est de convertir l'ADN circulaire en une forme surenroulée négative. La délétion ou certaines mutations de l'une ou l'autre des deux sous unités n'est pas viable pour la cellule. Parmi toutes les enzymes de cette famille, seul la gyrase est connu pour introduire du surenroulement négatif au dépend de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Son activité de décaténation est très faible comparé à son homologue la topoisomérase IV.

#### 5.1.4.2 La topoisomérase IV

La topoisomérase IV est composée de deux sous unités ParE et ParC (Kato et *al.*, 1988). Les protéines ParE et ParC sont respectivement homologues aux sous-unités GyrA et GyrB (Kato et *al.*, 1992; Champoux, 2001). Cette enzyme est étroitement liée à la résolution de catémères lors de la réplication. Elle est capable de relaxer aussi efficacement les deux types de surenroulement positif et négatif. La surproduction de topoisomérase IV supprime le phénotype de létalité d'un mutant *topA* (Kato et *al.*, 1990),



ce qui laisse supposer que lorsqu'elle est en forte concentration elle est capable de relaxer le surenroulement négatif.

### 5.1.5 Le surenroulement global

Grâce à une régulation homéostatique (Drlica, 1992) effectuée par la topoisomérase I et la gyrase, l'ADN bactérien est maintenu dans un état de surenroulement négatif favorable à la croissance. Les topoisomérases III et IV, n'interviennent pas directement dans ce mécanisme de contrôle sauf dans les conditions où elles sont surproduites (Broccoli et al., 2000; Kato et al., 1990; Zechiedrich et al., 2000).

L'abondance, mais aussi l'activité de la topoisomérase I et de la gyrase dépendent de la présence de leur substrat au niveau de l'ADN. Pour compenser la relaxation de l'ADN suite à l'inhibition de l'une des deux sous unités GyrA ou GyrB *in vivo* (Drlica et Snyder, 1978), la cellule se met à surproduire la gyrase uniquement lorsque son plasmide est dans un état relaxé ou en présence de topoisomérase I (Menzel et Gellert, 1983). La délétion de gène *topA* chez *E.coli* fait augmenter le niveau de surenroulement au-dessus de la normale si bien que la cellule pour pouvoir pousser normalement, accumule des mutations compensatoires dans les gènes *gyrA* ou *gyrB* (DiNardo et al., 1982). Ces mutations qui réduisent l'activité de la gyrase, ramènent le niveau du surenroulement en dessous du seuil normal (Pruss et al., 1982; Hammond et al., 1991). Autrement dit, le surenroulement négatif est introduit par la gyrase, alors que l'accumulation du surenroulement au-delà du seuil tolérable est prévenu par l'activité de la topoisomérase I.

### 5.1.6 Le surenroulement local

La réplication et la transcription perturbent de façon locale et transitoire le niveau de surenroulement de l'ADN (Wang, 1996). Durant la réplication semi-conservative, des supertours positifs s'accumulent en aval de l'ADN polymérase. La convergence des fourches de réplifications en sens inverse, peut aussi créer des tensions au niveau de la double hélice et générer des substrats pour les topoisomérases (Wang, 1996). D'importantes fluctuations du surenroulement dues à la transcription peuvent également

survenir. Ces dernières sont expliquées dans la théorie du « twin supercoiled domain » (Liu et Wang, 1987). Parce que l'ADN a une structure en double hélice, l'ouverture des brins créée par l'avancée du complexe transcriptionnel génère en aval des supertours positifs et en amont des supertours négatifs. Ces fluctuations de surenroulement local, sont des substrats potentiels pour la gyrase qui introduit des tours négatifs en aval de l'ARN polymérase (Figuroa et Bossi, 1988), de même que pour la topoisomérase I en amont de l'ARN polymérase qui relaxe les tours négatifs (Masse et Drolet, 1999a).

## 5.2 La transcription

### 5.2.1 La structure générale et la fonction de l'ARN polymérase

L'ARN polymérase a pour fonction principale de produire de l'ARN et ceci de façon optimale, dépendamment des conditions de croissance et de l'état des cellules (Mooney et al., 1998). L'existence de ce processus appelé transcription est la première étape dans l'expression des gènes. Pour réaliser sa tâche, l'ARN polymérase dispose d'une structure tridimensionnelle formée par les sous-unités  $\beta$  et  $\beta'$  et deux sous-unités  $\alpha$ . Une fois assemblée, l'ARN polymérase ressemble à une pince de crabe qui enveloppe l'ADN. Cette structure appelée « core » de l'enzyme, représente le noyau fonctionnel. *In vivo*, cette enzyme est retrouvée associée à différents facteurs de transcription dont l'ensemble forme un complexe. Par exemple, lorsque l'ARN polymérase est associée à un facteur sigma, elle forme une holoenzyme qui a la capacité d'interagir avec le promoteur pour initier la transcription.

La transcription est un processus cyclique divisé en trois événements : (1) l'initiation au cours de laquelle l'ARN polymérase se lie à l'ADN au site du promoteur (2) l'élongation au cours de laquelle il y a synthèse d'un ARN et (3) la terminaison qui correspond au moment où l'ARN polymérase quitte l'ADN et libère le brin d'ARN synthétisé. Seule l'étape d'initiation est réversible, car une fois engagée dans la phase d'élongation, l'ARN polymérase est assez stable sur l'ADN. La terminaison peut survenir à la fin du gène comme elle peut arriver aussi à plusieurs moments pendant l'étape d'élongation. La

transcription est également un processus dynamique. En plus de causer la formation des tensions au niveau de l'ADN (Liu et Wang, 1987), le complexe de transcription implique plusieurs molécules à différents moments et peut adopter différentes conformations (Hsu, 2002; Erie, 2002).

## **5.2.2 L'initiation de la transcription**

### **5.2.2.1 La formation du complexe fermé**

La liaison de l'ARN polymérase à l'ADN a lieu au niveau du promoteur du gène. Un promoteur typique, est une séquence d'ADN consensus avec certaines régions conservées. Ces régions conservées sont : (1) le point de départ de la transcription qui est souvent une purine, (2) la région - 10 à partir du point de départ ou boîte TATAAT, (3) la région - 35 ou une boîte TTGACA ainsi que (4) la distance entre - 10 et -35 de 16 à 18 nucléotides dans 90 % des cas. La liaison de l'ARN polymérase au promoteur permet la formation d'un complexe fermé, réaction qui est réversible car un équilibre peut se former entre la forme liée et non liée de l'ARN polymérase. Cet équilibre, qui dépend de la force de liaison de l'ARN polymérase et donc de sa stabilité au niveau du promoteur, est exprimée par une constante de liaison  $K_B$ . Cette constante est influencée par la capacité de l'ARN polymérase à reconnaître les séquences conservées du promoteur et par la liaison d'un facteur sigma à l'ARN polymérase. Quand on considère la grandeur du génome, la liaison d'un facteur sigma à l'ARN polymérase, autrement dit la formation de l'holoenzyme, lui confère la capacité de reconnaître spécifiquement un promoteur et améliore sa stabilité sur l'ADN. Il existe différents types de facteurs sigma ainsi que des promoteurs reconnus par ces facteurs (Lewin, 1994).

### **5.2.2.2 La formation du complexe ouvert**

Pour entrer en phase d'élongation, l'ARN polymérase doit quitter le promoteur et avancer dans le gène. Cette dernière étape de l'initiation implique le passage d'un complexe fermé à un complexe ouvert. Durant ce processus, de courts transcrits peuvent être

synthétisés puis relâchés. Dans cette situation de transcription abortive, l'ARN polymérase vacille entre le complexe fermé et le complexe ouvert tout en restant liée à l'ADN. En effet, le complexe d'initiation est sensible à la rifampicine (Ellinger, 1994) qui inhibe la formation de lien phosphodiester et non à l'héparine, qui se lie à l'ARN polymérase libre (Carpousis et Gralla, 1980; Hsu, 2002). Cette situation d'instabilité entre le complexe ouvert et fermé est exprimé par une constante  $K_2$ . Plusieurs facteurs peuvent influencer la formation du complexe ouvert. On distingue des facteurs intrinsèques et des facteurs extrinsèques.

Parmi les facteurs intrinsèques, on retrouve les premières séquences transcrites ainsi que la conformation de l'ADN. Comme décrit précédemment, la formation d'un complexe fermé stable peut influencer la formation d'un complexe ouvert. Contrairement à ce qui est attendu, tout changement dans la séquence du promoteur qui affaiblit la liaison avec l'ARN polymérase, facilite la fuite du promoteur. En effet, tout promoteur qui augmente l'interaction avec l'ARN polymérase, augmente la barrière de la fuite du promoteur, ce qui en résulte d'une part, à un blocage au niveau du promoteur (Ellinger et Gralla, 1994) et d'autre part, à un retard de la sortie du promoteur (Strainic et *al.*, 1998). Ceci est expliqué par le fait que cette même interaction qui lie l'ARN polymérase à son promoteur, doit être brisée si l'ARN polymérase veut échapper au promoteur pour synthétiser de l'ARN. Le passage d'un complexe fermé à un complexe ouvert, peut impliquer ou non le relâchement du facteur sigma et ceci dépend du gène transcrit (Ring et *al.*, 1996; review Hsu, 2002). Un autre facteur important dans la formation du complexe ouvert est l'état du surenroulement de l'ADN. Le surenroulement négatif permet l'ouverture des brins d'ADN ce qui favorise d'une part, la formation de complexe ouvert et d'autre part, l'ajout de nucléotides.

Parmi les facteurs extrinsèques qui influencent la formation du complexe ouvert, on distingue la concentration en nucléotides (Gralla et *al.*, 1980), ainsi que certaines molécules qui interagissent avec l'ARN polymérase. Le niveau de transcription abortive et productive augmente simultanément avec la concentration de nucléotides avant d'atteindre un plateau (Gaal et *al.*, 1997). Dans les cas où le complexe ouvert est dans un

état inactif, les facteurs GreA et GreB peuvent le secourir en clivant l'ARN, dans le but de repositionner le site actif de l'ARN polymérase au bout 3' du transcrit (Borukhov et al., 1992). Le passage vers un complexe ouvert productif suite à l'action de ces facteurs, est accompagné par une diminution du nombre de cycle de transcription abortive (Feng et al.; 1994; Hsu et al., 1995).

Quant à la force d'un promoteur, elle dépend de la fréquence d'initiation productive. Pour certains promoteurs, c'est la formation du complexe fermé ( $K_B$ ) alors que pour d'autres, c'est la formation de complexe ouvert ( $K_2$ ) qui limite la fréquence d'initiation et diminue les chances de passage vers l'élongation de la transcription (Hsu, 1992).

### 5.2.1 L'élongation de la transcription

Une fois l'épreuve de l'initiation passée, le complexe d'initiation devient un complexe d'élongation assez stable associé à l'ADN et à l'ARN synthétisé. L'élongation de la transcription consiste en l'ajout de nucléotides grâce à une liaison phosphodiester 5' vers 3'. Cette réaction qui a lieu dans le site actif de l'enzyme, peut se dérouler à une vitesse allant de 30 à 100 nucléotides ajoutés par seconde. Deux événements doivent avoir lieu pour permettre au complexe d'élongation de se déplacer rapidement vers la fin du gène. Premièrement, la translocation du bout 3' de l'ARN naissant du site  $i + 1$  au site actif  $i$  et deuxièmement, la translocation de l'ARN synthétisé (Mooney et al., 1998).

Plusieurs modèles de translocation ont été proposés. La translocation selon un mode monotone, avec un déplacement d'une paire de base à la fois (Yager et von Hipel, 1987) est celle qui est la plus répandue. Alternativement, l'ajout de deux nucléotides sans translocation immédiate et complète du complexe d'élongation, suivie un peu plus tard d'une translocation, a été proposée par Chamberlin. Ce dernier modèle appelé « inchworming » (Chamberlin, 1995), était supporté par des résultats de « footprint » (Krummel et Chamberlin, 1992). Cependant, une nouvelle interprétation de ces « footprints » (Komissarova et Kashlev, 1997) a permis de ramener le modèle dans un contexte monotone où l'ARN polymérase peut glisser librement sur l'ADN, tout en

déplaçant l'extrémité 3' de l'ARN du site actif. Dans cette situation, la translocation de l'ARN polymérase est discontinue (Nudler et *al.*, 1994) car elle oscille vers l'avant et vers l'arrière, autour de sa position centrale (Komissarova et Kashlev, 1997). Dans ce modèle, l'énergie de la translocation vers l'avant du complexe de transcription est fournie par l'ajout de nucléotides, en défaveur de l'oscillation de l'ARN polymérase (Landick, 1997; Gelles et Landick, 1998).

#### 5.2.4 La structure du complexe d'élongation de la transcription

La structure de plusieurs ARN polymérases de bactéries et de levures ont été déduites grâce à l'observation sous microscope électronique après cristallographie (pour revue voir Mooney et *al.*, 1998). Ces ARN polymérases partagent des similarités au niveau de leur structure et de leur fonction. Plus récemment, la structure du complexe d'élongation de l'ARN polymérase de *Thermus aquaticus* (*Taq*), (Korzheva et *al.*, 2000), qui est fortement similaire à celle de la RNAP II de levure et à celle de *E. coli*, a permis de proposer un modèle fonctionnel du complexe d'élongation (Korzheva et Mustaev, 2001).

L'ARN polymérase de *Taq* a la forme d'une pince de crabe avec les sous-unité  $\beta$  et  $\beta'$  formant chacun un bras de la pince. L'ARN et l'ADN se lient sur toute la longueur de la rayure formée par les pinces. Le site actif de l'enzyme se trouve dans la rayure au niveau où elle forme une charnière. L'hybride ARN-ADN est enveloppé dans ce tunnel entre le site catalytique  $Mg^{2+}$  et un élément appelé gouvernail. Au niveau du  $Mg^{2+}$  se retrouve un canal secondaire qui accommode les nucléotides vers le site actif. Faisant suite au premier canal, est branché le canal de sortie du bout 5' de l'ARN naissant.

Le premier site d'importance est celui où l'ADN double brin se lie à l'ARN polymérase et entre dans le canal principal (DBS) : au début de son trajet l'ADN est en contact avec la partie  $\beta'$  et est couverte par la suite (comme un toit) par la partie  $\beta$ . Cette partie, qui peut agir comme une pince glissante, est suivie par l'ouverture des brins et la formation de la bulle de transcription. La bulle de transcription, qui inclue la région où se forme l'hybride ARN-ADN, est délimitée en aval par le site actif comprenant le  $Mg^{2+}$  et en

amont par le gouvernail. Le gouvernail aurait deux fonctions importantes, (1) celle de séparer l'hybride ARN-ADN et (2) celle de limiter l'expansion de la bulle de transcription. Les deux parties qui délimitent la bulle de transcription, fonctionneraient comme une fermeture éclair qui empêche l'hybride ARN-ADN de s'allonger. De ce fait, l'hybride est maintenu autour de 8 à 9 paires de base dans la bulle de transcription. À la sortie de cette région, on retrouve l'ADN double brin dans le tunnel principal.

Ces résultats ont été obtenus sur un ADN linéaire. *In vivo*, le surenroulement de l'ADN, la taille de la bulle de transcription ainsi que celle de l'hybride ARN-ADN peuvent varier et modifier la structure de l'ARN polymérase (section plus bas).

## **5.2.5 Les facteurs intrinsèques qui influencent l'élongation**

### **5.2.5.1 L'hybride ARN-ADN**

La longueur ainsi que le rôle de l'hybride ARN-ADN dans la bulle de transcription ont longtemps été débattus. Pour certains, l'existence d'un hétéro duplexe ARN-ADN de 9 à 12 paires de bases joue un rôle important dans la stabilité de l'ARN polymérase. Dans des études de thermodynamiques, Yager et von Hippel ont émis comme hypothèse que l'hybride de 12 paires de bases compensait le niveau d'énergie de l'ouverture des brins d'ADN dans la bulle de transcription. Dans le cadre de ce modèle, des duplexes ARN-ARN comme par exemple des épingles à cheveux, rendent le complexe de transcription instable (Yager et von Hippel, 1991).

Dans une autre théorie, Chamberlin émet comme hypothèse que la longueur de l'hybride ARN-ADN n'est que de 2 à 3 nucléotides et n'intervient pas dans la stabilité de l'ARN polymérase (Chamberlin, 1995). Ces arguments étaient basés sur le fait que la digestion de l'ARN par les ribonucléases, n'affectait pas les compétences du complexe de transcription si 2 ou 3 nucléotides étaient épargnés (Rice et *al.*, 1991). Malgré ces résultats, des expériences de « cross-link » ont démontrés que l'hybride ARN-ADN

reste aligné (Nudler et *al.*, 1997) dans la bulle et que sa longueur est de 8 à 9 paires de bases, à partir de la position + 1 du site actif (Lee et Landick, 1992; Nudler et *al.*, 1997 Cell). Des études récentes révèlent la contribution importante de l'hybride ARN-ADN dans la stabilité (Kireeva et *al.*, 2000a), et la processivité du complexe d'élongation (Nudler et *al.*, 1996; Siderenkov et *al.*, 1998; Korzheva et Mustaev, 2001).

### 5.2.5.2 L'interaction de l'ARN polymérase avec l'ARN et l'ADN

Une réduction du nombre de nucléotides dans la région DBS, diminue la stabilité du complexe de transcription (Korzheva et Mustaev, 2001; Nudler et *al.*, 1996). Cette même région influence les pauses (voire plus bas) ainsi que la terminaison. Le brin d'ADN codant, celui qui ne sert pas de matrice, interagit aussi avec l'ARN polymérase et semble lui conférer une stabilité latérale (Mooney et *al.*, 1998). Le bout 5' de l'ARN dans le canal de sortie de l'ARN polymérase, améliore la stabilité du complexe en empêchant ce dernier de reculer (Nudler et *al.*, 1997; Nudler et *al.*, 1996). Dans certaines conditions, l'ARN synthétisé sortie de l'ARN polymérase peut former des structures en épingles à cheveux et induire des pauses (section suivante).

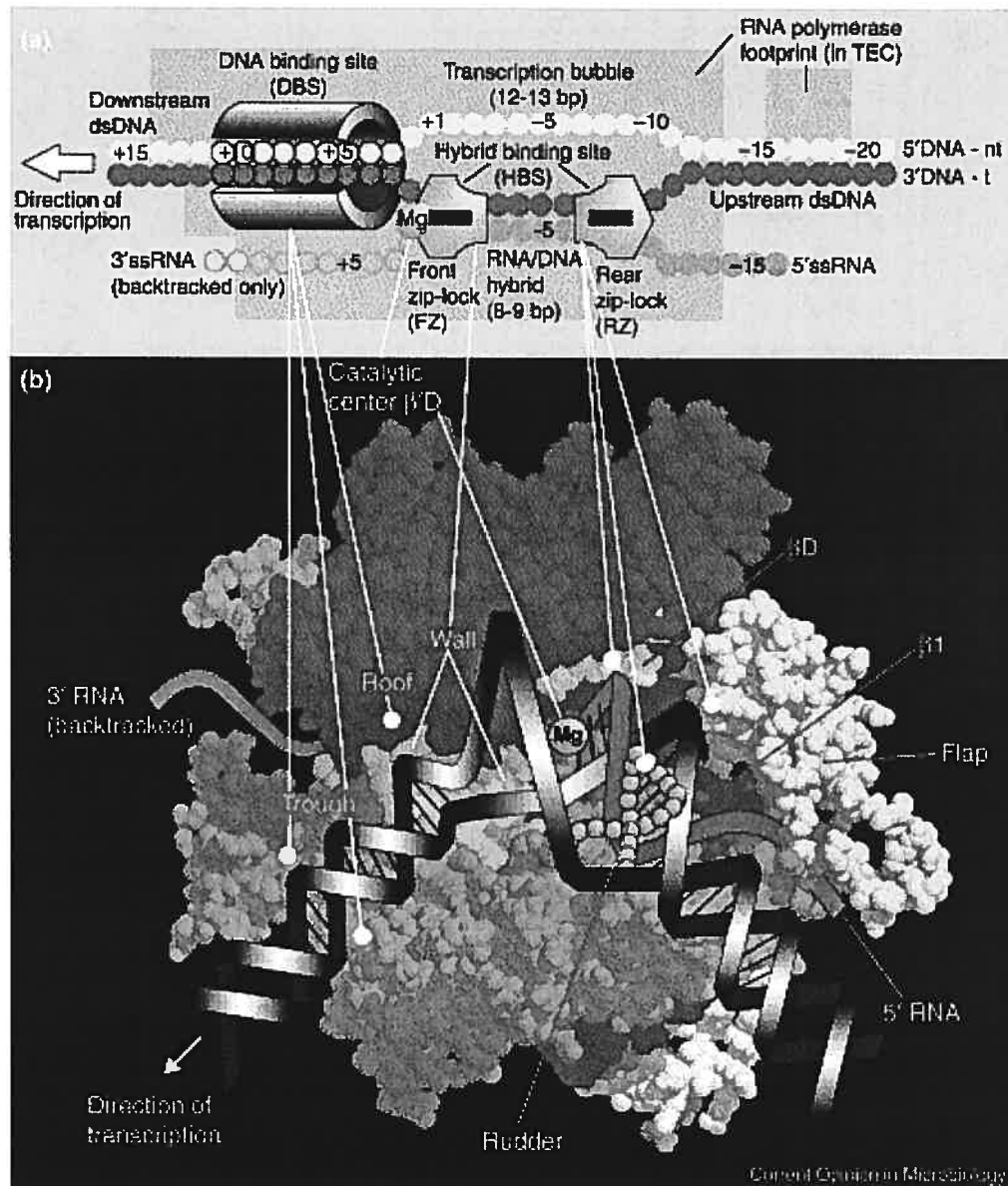
### 5.2.6 Les pauses, les arrêts et la terminaison

L'élongation de la transcription est ponctuée par des signaux de pauses qui ralentissent l'addition de nucléotides (Foster et *al.*, 2001), conduisant à un arrêt et parfois à une terminaison. Quand l'ARN polymérase rencontre des signaux de pauses, elle adopte une conformation inactive (Erie et *al.*, 1993; Artsimovitch et Landick, 2000). Ceci se traduit par une modification de l'emplacement du site actif de l'enzyme qui n'est plus aligné en face de l'extrémité 3'OH de l'ARN. Ces changements de conformations qui sont la cible de protéines régulatrices, sont non seulement induites par des pauses dictées par l'information écrite dans l'ADN, mais sont également causées par les multiples interactions que peut avoir l'enzyme avec l'ARN et l'ADN. Une fois inactivée, l'ARN polymérase peut induire rapidement le clivage du transcrit et libérer son site actif pour l'incorporation de nouveaux nucléotides (Surratt et *al.*, 1991).



Alternativement, l'ARN polymérase peut adopter une série de changements de conformation qui conduisent à l'arrêt de la transcription. Contrairement aux pauses qui peuvent causer la terminaison, les arrêts transcriptionnels sont en général irréversibles et n'entraînent pas la dissociation du complexe d'élongation. L'état de « backtrack », qui dépend de la stabilité de l'hybride ARN-ADN et est surtout sensible à GreA (Nudler et al., 1997; Palangat et Landick, 2001), consiste en une translocation vers l'arrière du complexe de transcription qui libère l'extrémité 3' de l'ARN via le canal secondaire (Komissarova, 1997; Korzheva et Mustaev, 2001). Dans cet état, l'ARN polymérase ne peut continuer à transcrire, même en présence d'une forte concentration de nucléotides. Les facteurs GreA et GreB peuvent secourir ce complexe en clivant l'ARN à partir de son bout 3', afin de libérer le site actif de l'enzyme (Burkhov et al., 1993; Arstimovitch et Landick, 2000). Parce qu'un ARN antisens élimine la structure en épingle à cheveux et restore la sensibilité à GreA (Arstimovitch et Landick, 1998), la formation d'une telle structure en épingle à cheveux lors de la transcription du gène *his*, peut induire une pause du complexe transcriptionnel qui se retrouve dans un état dit « hypertranslocated » (Toulokhonov et al., 2001). Dans cette situation l'extrémité 3' du transcrit est désengagé du site, et le complexe de transcription en pause (Arstimovitch et Landick, 2000) est résistant au facteur GreA (Feng et al., 1994) et à la pyrophosphorolyse (Arstimovitch et Landick, 1998).

Il existe deux types de terminaisons qui requiert comme signal de pause, la formation d'une structure en épingle à cheveux. Ces deux types de pause sont suivit d'un ralentissement de l'ajout de nucléotides et d'un décrochage de l'hybride et de l'ARN polymérase. La terminaison Rho-indépendante survient lorsque l'ARN polymérase rencontre une séquence de 7 à 9 nucléotides riche en G et C, capable de former une structure en épingle à cheveux suivit d'une série d'environ 10 uraciles (Roberts, 1996). La terminaison Rho-dépendante implique la liaison du facteur de terminaison Rho à des séquences riches en C sur l'ARN synthétisé. Dans un mécanisme décrit par Richardson, la protéine Rho avance en déroulant l'ARN vers le complexe transcriptionnel, pour le désengager (Richardson, 1996).



**Figure 2: Structure de l'ARN polymérase en phase d'élongation de la transcription.** Tiré de Korzheva et Mustaev, 2001.

### **5.2.7 La stabilité de l'ARN**

La stabilité de l'ARN messenger peut affecter le niveau d'expression des gènes, de même que la régulation de l'élongation de la transcription. De ce fait, au lieu de transcrire activement, les cellules peuvent s'adapter rapidement aux stress de l'environnement en stabilisant certains ARNs (Grunberg-Manago, 1999). Les ARNs messagers des procaryotes sont généralement très instables et leur demi-vie varie entre une et 30 minutes (Nierlich et Murakawa, 1996).

La dégradation des ARNs par des ribonucléases et leur traduction en protéines sont les deux facteurs qui contrôlent la stabilité des ARNm. La dégradation des ARNs est initiée par un endoclivage par la RNase E ou par la RNase III. Ce clivage endonucléotidique est suivi par une dégradation exonucléotidique par la PNPase et la RNase II à partir de nouveaux bouts 3' libres. La dégradation a une polarité nette de 5' vers 3' (Coburn et Mackie, 1999). En effet, elle commence au bout 5' vers 3' par le clivage endonucléotidique et est suivie par la dégradation exonucléotidique de 3' vers 5' (Grunberg-Manago, 1999). Certaines structures que peut prendre l'ARN ou encore l'attachement de ribosomes sur l'ARN, peuvent protéger les sites de clivage par la RNase E et augmenter la stabilité de l'ARN. Le découplage entre la traduction et la transcription, qui augmente la quantité d'ARN dégradé dans la cellule (Iost et Dreyfus, 1995), peut être corrigé par l'inactivation de la RNase E ou par la surproduction de protéines qui se lient à l'ARN (Iost et Dreyfus, 1994). Plusieurs inhibiteurs de traduction, comme le chloramphénicol et la tétracycline, bloquent les ribosomes sur l'ARN et sont connus pour avoir un effet stabilisateur du transcrit (Peterson, 1993).

## **5.3 Le surenroulement et la transcription**

### **5.3.1 Le surenroulement global et la transcription**

Les effets du surenroulement global sur l'expression des gènes sont variés. Ils peuvent augmenter, diminuer ou encore ne pas affecter l'expression d'un gène. Lorsque l'ADN

est négativement surenroulé, il s'agit principalement de l'ouverture des deux brins d'ADN et de son effet sur l'initiation de la transcription.

Le surenroulement négatif facilite l'ouverture des brins d'ADN et la liaison de l'ARN polymérase à son promoteur (Saucier et Wang, 1972; Richardson, 1975ab). Avec l'augmentation du surenroulement négatif, la formation d'un complexe ouvert ( $K_2$ ) est favorisée alors que la liaison de l'ARN polymérase à son promoteur ( $K_B$ ) est peu affectée. Cependant, cette augmentation du surenroulement au-delà du seuil physiologique, diminue l'initiation à cause de l'abortion du complexe transcriptionnel. Un exemple bien connu est l'initiation du gène *lacZ*, qui dépend de l'effet synergique de son activateur CRP et du niveau du surenroulement négatif de l'ADN (Meiklejohn et Gralla, 1989). Il a été montré que CRP favorise la stabilisation du complexe fermé et le passage vers un complexe ouvert (Straney et al., 1989). La formation de complexes ouverts, augmentent avec le surenroulement négatif et atteint un maximum avant de diminuer lorsque le surenroulement négatif devient excessif. Une mutation UV5 dans la région -10 (Silverstone et al., 1970; Arditti et al., 1968), augmente la stabilité de l'ARN polymérase et la rend indépendante de CRP.

Le seul exemple de la stimulation de promoteur par la relaxation du surenroulement négatif de l'ADN est observé au niveau des gènes *gyrA* et *gyrB* (Menzel et Gellert, 1987).

### 5.3.2 Le surenroulement local et la transcription

Liu et Wang (Liu et Wang, 1987), ont proposé en 1987 le modèle du « twin supercoiled domain » en se basant sur les observations suivantes : (1) la masse importante représentée par le complexe transcriptionnel et l'ARN naissant qui aurait des difficultés à tourner autour de l'ADN, suggère que c'est l'ADN qui devrait tourner autour de son axe, (2) l'association de la topoisomérase I avec des gènes activement transcrit chez les eucaryotes, (3) le surenroulement positif du plasmide pBR322 extrait de souches traitées avec des inhibiteurs de gyrase et (4) dans un mutant *topA*<sup>-</sup> la transcription du gène *tetA* génère des plasmides hypersurenroulés négativement (Pruss et Drlica, 1986; Pruss,

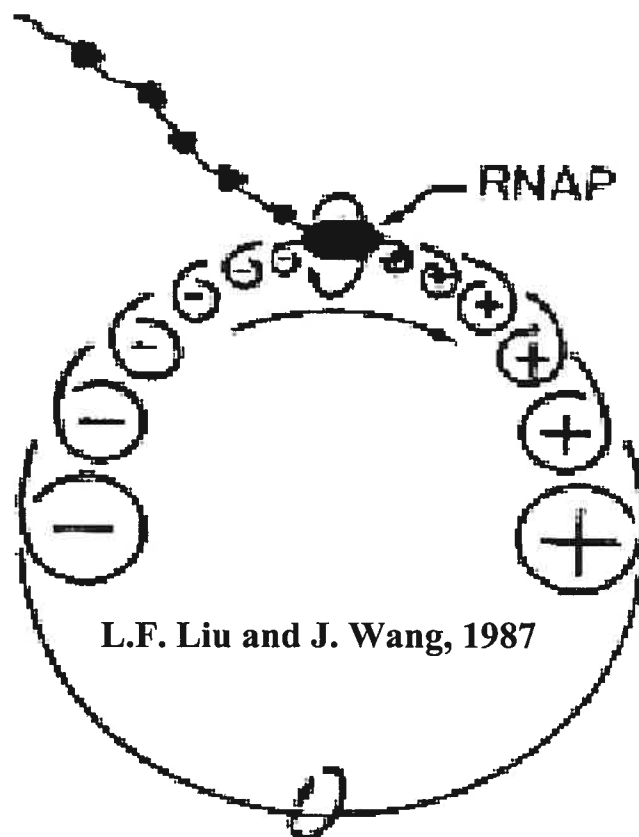
1985). Un plasmide est hypersurenroulé négativement lorsque la chloroquine en saturation, n'arrive pas à séparer les topoisomères les plus négatifs.

Chez les procaryotes, la traduction couplée à la transcription implique l'ARN polymérase, l'ARN naissant, les ribosomes qui y sont attachés ainsi que la chaîne d'acides aminés nouvellement synthétisée. À cause de sa taille importante, ce complexe ne peut apparemment pas tourner autour de l'ADN, c'est plutôt l'ADN qui au fur et à mesure que le complexe de transcription se déplace, tourne autour de son axe.

À cause de sa structure en hélice de pas droit, l'ouverture de l'ADN introduit du surenroulement positif en aval et du surenroulement négatif en amont du complexe d'élongation. En considérant que la vitesse de transcription peut atteindre 100 nt par secondes (Mooney et *al.*, 1998), et que dans certains cas où les mouvements du complexe transcriptionnel peuvent être entravés par sa fixation à la membrane cellulaire, comme c'est le cas pour la synthèse de TetA, des changements dans le surenroulement de l'ADN au niveau local peuvent être très élevés. Si l'on considère en plus que les événements de transcription sont continus et impliquent plusieurs ARN polymérases sur un même gène ou plusieurs gènes simultanément, le « twin-supercoiled domain » peut causer des changements topologiques importants au niveau de l'ADN.

Quand le positif en aval et le négatif en amont générés par la transcription peuvent s'annuler, aucune variation topologique de l'ADN n'est observée. Ceci peut être vrai lorsqu'il y a plusieurs ARN polymérases en transcription synchronisée. Cependant, lorsque les polymérases ARN ne sont pas synchronisées ou encore dans le cas de transcription de deux gènes divergents, de fortes tensions positives qui s'accumulent ne peuvent s'annuler avec le négatif à cause de la barrière physique que représente l'ARN polymérase sur l'ADN (Drolet et *al.*, 1994).

Depuis 1987, de nombreux travaux ont supporté le modèle du « twin-supercoiled domain » de manière convaincante. Des expériences *in vitro* montrent l'induction du surenroulement négatif et positif par la transcription (Wu et *al.*, 1988; Tsao et *al.*, 1989; Ostrander et *al.*, 1990; Rahmouni et Wells, 1992). Le principe de diffusion et de



**Figure 1: Modèle de « twin supercoiled domain ».** Le déplacement du complexe d'élongation génère du surenroulement positif en avant, et du surenroulement négatif en arrière de l'ARN polymérase. Tiré de Liu et Wang, 1987.

l'annulation entre elles des tensions positives et négatives générées de part et d'autre de l'ARN polymérase, a également été prouvé *in vitro*. Ce phénomène dépend de la vitesse de diffusion de la tension par rapport à celle de la transcription qui génère cette tension (Wang et Droge, 1997). La preuve que plusieurs facteurs affectent la rotation libre de l'ARN polymérase a été rapportée par plusieurs études. Ces facteurs incluent le couplage transcription-traduction, l'encrage à la membrane (Lodge et *al.*, 1989), l'interaction de protéines avec le complexe de transcription (Gartenberg et Wang, 1993; Mirabella et Gartenberg, 1997) et certaines protéines qui stabilisent une boucle ADN (Wu et Liu, 1991). Dans des études sur la transcription du gène *tetA*, l'hypersurenroulement plasmidique en absence de topoisomérase I, était principalement causé par l'encrage à la membrane du produit de ce gène (Lodge et *al.*, 1989; Cook et *al.*, 1992; Lynch et Wang, 1993). Ces travaux se basaient sur le fait que l'absence d'encrage à la membrane abolissait la formation de plasmides hypersurenroulés. Plus récemment, il a été démontré que les souches *topA<sup>-</sup>* (DM800) utilisées dans ces études contenaient en plus de la mutation *gyrB225*, une autre mutation compensatoire suffisante pour masquer l'effet de l'absence de la topoisomérase I sur la transcription. En utilisant cette fois-ci de nouveaux mutants de topoisomérase I et en éliminant l'encrage à la membrane, la transcription du gène *TetA* réussit à générer des plasmides hypersurenroulés (Massé et Drolet, 1999a). Ces dernières données, permettent de recentrer l'importance de la transcription dans les changements topologiques au niveau local sur l'ADN.

D'autres expériences sur la transcription divergente ont été réalisées pour comprendre la correction de la mutation *leu500* par des mutations *topA<sup>-</sup>* de *Salmonella typhimurium*. Cette mutation dans la boîte TATA, est une transition A-G qui inactive le promoteur. La réactivation du promoteur de *leu500* par délétion de *topA* (Pruss et Drlica, 1985; Trucksis et *al.*, 1981; Margolin et *al.*, 1985), est la conséquence de l'activation de deux promoteurs adjacents et divergents, *ilvH* et *leuO*, dont l'expression génère du surenroulement négatif qui diffuse vers le promoteur de *leu500* et l'active (« promoteur relay mécanisme » ; Wu et *al.*, 1995; Fang et Wu, 1998a,b).

En insérant dans l'ADN des séquences qui adoptent une forme Z ou H lorsque il y a un changement du surenroulement (Rahmouni et Wells, 1989), les variations du

surenroulement causé par la transcription selon le « twin supercoiled domain » ont pu être observé *in vivo* dans le contexte de souches sauvages (Krasilnikov et al., 1999; Rahmouni et Wells, 1992; Albert et al., 1996; Leng et McMacken, 2002).

### 5.3.3 Les mutations associées à la transcription

Il est bien connu que la transcription induit des mutations au niveau de gènes. Ce phénomène appelé TAM pour transcription associated mutation, est connu pour le gène  $\beta$ -galactosidase chez *E.coli* dont les mutations sont stimulées pendant la transcription en présence d'un agent alkylant (Brock, 1971). D'autres exemples de TAM existent chez *E.coli* (Beletskii et Bhagwat, 1996; Wright et al. 1999) et chez la levure (Datta et Jinks-Roberston, 1995). Ces mutations surviennent souvent durant la réplication en conséquences de lésions antérieures au niveau de l'ADN. Toutefois, les réactions chimiques sont plus efficaces sur le simple brin ADN que sur le double brin (Aguilera, 2002). De ce fait, l'ouverture des brins par l'accumulation de surenroulement négatif durant la transcription peut aboutir à la formation de régions simple brins favorisant l'accès aux agents chimiques (Aguilera, 2002). Les TAM peuvent également jouer un rôle dans l'évolution (Rosenberg, 1997; Wright et al., 1999).

### 5.3.4 La recombinaison associée à la transcription

La transcription est aussi un facteur important dans la stimulation et la modulation de la recombinaison (Aguillera et al., 2000). Le TAR pour « transcription associated recombinaison », a été observé chez *E.coli*, chez le phage  $\lambda$  (Ikeda et Matsumoto, 1979) et chez la levure (Aguillera, 2002). Plus récemment, une expérience montre que la transcription chez la levure en absence des protéines Rad (équivalent aux protéines Rec de *E.coli*), induit la recombinaison de façon similaire à des cassures double brin (Gonzales-Barrera et al., 2002).

D'autre part, des collisions peuvent survenir entre les fourches de réplication et les complexes de transcription. Ces collisions, peuvent générer des nœuds au niveau de l'ADN, causés par l'accumulation de supertours positifs en aval des deux fourches.



L'arrêt de la réplication induit par ce phénomène, peut causer l'instabilité de certains plasmides et la perte de matériel génétique (Vilette *et al.*, 1995).

La recombinaison peut aussi être stimulée chez la levure par l'accumulation de supertours positifs et négatifs comme c'est le cas lors d'une déficience en topoisomérases (Trigueros et Roca, 2001) ou par l'accumulation de supertours négatifs pendant la transcription, qui active la recombinaison de séquences *Res in vitro* (Wang et Droge, 1997). Ces études expliquent un peu mieux le rôle et l'importance qu'ont les topoisomérases, de préserver l'intégrité de l'ADN en régulant le surenroulement local pendant la transcription.

### 5.3.5 L'hypersurenroulement et la formation des R-loops

Les effets *in vivo* de la transcription sur le surenroulement, nous viennent de l'étude des mutants *topA<sup>-</sup>*. C'est en absence de la topoisomérase I que la transcription peut générer du surenroulement négatif (Pruss et Drlica, 1986; Wu *et al.*, 1988). Dans des mutants *topA<sup>-</sup>*, il a été démontré que la transcription du gène *tetA* sans traduction génère de l'hypersurenroulement uniquement quand la gyrase est pleinement active (section plus haut). En effet, la formation de plasmides hypersurenroulés par la transcription *in vitro*, a lieu lorsque la gyrase est présente (Phoenix *et al.*, 1997) et *in vivo*, quand des cellules *topA<sup>-</sup>* possèdent une mutation compensatoire dans la gyrase qui diminue son activité, aucun plasmide hypersurenroulé ne peut être isolé. Puisque cet état hypersurenroulé en absence de topoisomérase I est sensible à la surproduction de la RNase H, il est également lié à la formation de R-loops (Masse et Drolet, 1999c). Dans un modèle proposé pour la formation des R-loops, la gyrase introduit du surenroulement négatif pendant la transcription et favorise la formation d'hybrides ARN-ADN (Masse et Drolet, 1999c). Ces R-loops sont responsables de la formation de l'hypersurenroulement des plasmides car ils empêchent la fermeture des deux brins d'ADN.

Le mécanisme de formation de R-loops n'a pas été démontré de façon directe. Cependant plusieurs évidences (Drolet *et al.*, 2003) supportent deux mécanismes de formation des R-loops.

Premièrement, la formation des R-loops peut être initiée à partir de la bulle de transcription et est dans ce cas, directement liée aux mécanismes de transcription. L'hybride ARN-ADN dans la bulle de transcription est maintenu autour de 8 à 9 paire de bases dans l'ARN polymérase (section plus haut). Le surenroulement négatif en amont de la polymérase ARN généré selon le « twin supercoiled domain », peut diffuser sur l'ADN et empêcher la réhybridation des deux brins d'ADN. Ceci aurait pour conséquence de modifier la taille de la bulle de transcription et de changer la qualité de l'hybride dans la bulle. Dans des expériences de transcription sur un ADN surenroulé négativement, le complexe d'élongation de T7 peut exister sous une forme où l'ARN est déplacé de l'ADN et interagit avec l'ARN polymérase (modèle décrit auparavant) ou dans un état où l'hybride ARN-ADN devient plus long et plus sensible à la RNase H. Dans ce dernier cas, l'ARN polymérase devient instable sur l'ADN. L'un ou l'autre de ces états est influencé par l'énergie de réappariement des brins d'ADN qui dépend de la séquence nucléotidiques et de l'état de surenroulement de l'ADN (Gopal *et al.*, 1999). Une autre série d'expériences dans laquelle l'hybride ARN-ADN est très sensibles à la RNase H et très résistants à la RNase A et T (deux ribonucléases qui s'attaquent à l'ARN libre), supposent que l'ARN reste hybridé à l'ADN et que les R-loops sont initiés à partir de la bulle de transcription (Drolet *et al.*, 2003).

Dans une deuxième hypothèse, la formation de R-loops est initiée en arrière de la polymérase entre l'ARN libre et l'ADN simple brin non réhybridé. Daube et von Hipel (1994), à partir de séquences non homologues sur l'ADN, montrent que la bulle de transcription devient permanente ce qui facilite la réhybridation avec le brin matrice de l'ARN auparavant déplacé de l'hybride. Que l'hybride soit initié dans la bulle de transcription ou par l'ARN libre en dehors de la bulle, il semble dans les deux cas que le surenroulement négatif favorise la formation des R-loops.

### **5.3.6 Le rôle de la topoisomérase I durant l'élongation de la transcription**

Plusieurs évidences que la topoisomérase I est impliquée dans le processus d'élongation de la transcription ont été fournies. En utilisant la camptothecin comme poison de

topoisomérase I, de nombreuses observations montrent que les topoisomérases I sont concentrées au niveau des gènes activement transcrits chez les eucaryotes (Fleishmann et al., 1984; Gilmour et al., 1986; Zhang et al., 1988; Stewart et al., 1990). Une autre étude démontre *in vivo* et *in vitro* l'interaction entre le domaine C-terminal de la topoisomérase I bactérienne et la partie  $\beta'$  de l'ARN polymérase (Cheng et al., 2003).

L'absence de la topoisomérase I est nuisible pour la croissance cellulaire (DiNardo et al., 1982; Pruss et al., 1982) à moins que la RNase H, une enzyme qui dégrade la partie ARN d'un hybride ARN-ADN, ne soit surproduite (Drolet et al., 1995). Le fait que la surproduction de la RNase H complémente la croissance d'un mutant *topA* nul, établit une forte corrélation entre la topoisomérase I et son rôle dans l'inhibition de la formation de R-loops. En accord avec l'hypothèse que la topoisomérase inhibe la formation de R-loop durant la transcription, des supresseurs multicopies de mutants *topA* qui n'ont pas d'effet sur le surenroulement global, comme la RNase H (Drolet et al., 1995; Masse et Drolet, 1999a) et la topoisomérase III (Broccoli et al., 2000) ont été isolés. La Topoisomérase III comme décrit précédemment a besoin pour son activité d'une région simple brin d'ADN (Champoux, 2001) assez stable (Digate et Marians, 1988). Son rôle est surtout la décaténation des brins d'ADN, mais elle peut aussi cliver l'ARN et désenroulé l'ADN en présence de l'hélicase RecQ (Champoux, 2001). Le rôle de la topoisomérase I dans l'inhibition des R-loops a également été montré *in vitro* sur un plasmide surenroulé négativement. Dans cette étude, la topoisomérase I relaxe plus efficacement un plasmide contenant un R-loop que le même plasmide sans R-loop (Phoenix et al., 1997).

En regard des ces évidences, si l'on considère que le rôle de la topoisomérase I est de prévenir la formation de R-loops durant la transcription, alors l'augmentation du surenroulement global n'est qu'une conséquence secondaire de l'absence de topoisomérase I (Masse et Drolet, 1999; et section précédente). En effet, il n'y a pas d'inhibition de la croissance des souches possédant une mutation non-sens *topA10* qui permet à la topoisomérase I de garder une activité résiduelle (Pruss et Drlica, 1982; Drolet et al., 2003), et ceci malgré la présence d'un surenroulement négatif plus élevé

comparé à celui de la souche sauvage. Contrairement à ce dernier cas, la délétion de *topA* même en présence d'une gyrase moins active nous permet d'isolé des plasmides hypersurenroulés (Pruss, 1985). Finalement, pour appuyer ce rôle de la topoisomérase I dans l'inhibition des R-loops, le gène *rnhA* qui n'est pas essentiel pour la survie cellulaire le devient dans un mutant *topA* nul. En effet, un double mutant *topA<sup>-</sup> rnhA<sup>-</sup>* n'est pas viable (Drolet et *al.*, 1995) malgré que le surenroulement est maintenu très bas en dessous de celui de la souche sauvage par une mutation compensatoire dans la gyrase. Cette même mutation dans la gyrase introduite dans un mutant *rnhA* améliore la croissance de ce dernier (Drolet et *al.*, 1995).

## 5.4 Les R-loops et leurs séquences sur les fonctions de l'ADN

### 5.4.1 Initiation de la réplication

La réplication du chromosome des bactéries requiert l'ouverture des brins d'ADN et la formation d'une bulle de réplication. Dans certaines conditions (Kogoma, 1986), la formation d'un R-loop ailleurs qu'à l'origine de réplication *oriC*, permet l'ouverture des brins et favorise l'initiation de la réplication. C'est dans un mutant *rnhA* qui ne possèdent pas d'activité RNase H, que peut arriver ce phénomène nommé cSDR (constitutive stable DNA réplication). Le cSDR dépend de la transcription (von Meyenburg et *al.*, 1987) car il est sensible aux inhibiteurs de la transcription comme la rifampicine. Dans ces conditions, les mutants *rnhA* (Kogoma, 1986) de *E.coli* sont capables de répliquer leur chromosome en absence de la protéine DnaA et de l'origine de réplication *oriC*. Il a été proposé que de longs hybrides persistants et sensibles à la RNase H, se formaient dans ces mutants (Asai et Kogoma, 1994a). Dans cette étude, le rôle de la RNase H était d'éliminer ces hybrides afin de préserver la spécificité d'initiation DnaA-dépendante à *oriC* (Kogoma et *al.*, 1985, Ogawa et *al.*, 1984). Cependant, la réplication à *oriC* requiert en son aval, la formation d'un R-loop de 500 pb pour l'ouverture des brins et l'assemblage du complexe de réplication (Baker et Kornberg, 1988).

### 5.4.2 Recombinaison

Une autre façon de stimuler la recombinaison est la formation de R-loops (comme décrit précédemment). Ceci est le cas pour la commutation de classe des Immunoglobulines qui a lieu grâce à un processus de recombinaison, impliquant une transcription très active (Jung et *al.*, 1993; Zhang et *al.*, 1993) et la formation d'un R-loop. Dans des souches *rnhA<sup>-</sup>*, en plus d'activer l'initiation de la réplication, l'absence de la RNase H favorise l'expression constitutive de la réponse SOS. Dans le cas où l'expression du gène *rnhA* est diminuée la réponse SOS est induite par une perte d'intégrité de l'ADN (Quinones et *al.*, 1987; Asai et Kogoma, 1994b)

### 5.4.3 Élongation de la transcription

La longueur de l'hybride ARN-ADN influence la stabilité et la processivité du complexe d'élongation (section précédente). Un hybride plus petit que 8 paires de bases semble diminuer la stabilité du complexe et est requis pour la terminaison (Komissarova et *al.*, 2002). L'allongement de l'hybride au-delà de 12 paires bases diminue également la processivité du complexe de transcription de la polymérase ARN II chez les eucaryotes (Kireeva et *al.*, 2000a). Tomizawa et Masukata (1987) montrent que la formation de longs et persistants R-loops, induit la dissociation du complexe transcriptionnel et la terminaison. Cet hybride fait terminer la transcription à une succession de poly A et poly T. Dans cette même étude, la production de la RNase H a pour effet d'éliminer les problèmes de terminaison.

Des problèmes causés par la formation des R-loops durant la transcription des opérons ribosomiaux en absence de topoisomérase I, ont également été identifiés (Hraiky et *al.*, 2000). Dans cette étude, la surproduction de la RNase H corrige ces problèmes de transcription. Dans une autre série d'expériences, la surproduction de la RNase H permet aux mutants *topA<sup>-</sup>* de pouvoir résister à un « shift-up » nutritionnel (qui nécessite une production accrue de ribosomes; Drolet et *al.*, 1995), de même qu'elle stabilise un plasmide (pNO1302) contenant une séquence *boxA* et une partie incomplète de *rrnB* fortement transcrit (Masse et Drolet, 1997). Il serait également utile de mentionner que

les souches *rnhA*<sup>-</sup> sont sensibles aux « shift-ups » nutritionnels (Torrey et *al.*, 1984; Kogoma et *al.*, 1985).

### 5.5 Le surenroulement et le stress

Les conditions environnementales dans lesquelles vivent les microorganismes sont souvent extrêmes, et induisent des stress auxquelles les cellules doivent s'adapter pour rester en vie. Dans ce contexte, une des conditions pour la survie est le maintien dans une limite tolérable, de l'intégrité du milieu intérieur cellulaire. Une des façons pour se défendre vis à vis de ces stress, est la synthèse de nouvelles molécules ou facteurs de stress. Ces facteurs permettent à la cellule de s'adapter et supposent une modification dans l'expression génique, accompagnée souvent d'une modification de la topologie de l'ADN. Certains ont même proposé que ces changements topologiques de l'ADN agiraient comme des senseurs pour l'expression de gènes de résistance aux stress (Wang et Syvanen, 1992). Dans cette étude, le changement du surenroulement permet au promoteur d'adopter une conformation adéquate, ce qui le rend plus accessible à des facteurs sigma.

Parmi les facteurs de stress aux basses et hautes températures on distingue les chaperonnes ainsi que la topoisomérase I et la gyrase. Suite à un stress de haute température, une relaxation transitoire de l'ADN associée à la synthèse de facteurs de stress, dépend du niveau d'activité de la gyrase et de la topoisomérase I (Mizushima et *al.* 1993; Mizushima et *al.*, 1997; Ogata et *al.*, 1994). Dans le cas d'un stress à basse température, l'ADN est transitoirement surenroulé négativement à cause de l'activité combinée de la gyrase et de HU (protéine qui lie l'ADN). Une étude antérieure à celle ci, avait démontré que la gyrase et la protéine CS7.4 étaient des facteurs de stress à basse température (Jones et *al.*, 1992). Comme le montrent les expériences en présence d'inhibiteurs de la traduction (Mizushima et *al.*, 1997; Mizushima et *al.*, 1993), les changements topologiques de l'ADN suite aux stress de températures ne sont pas associés à la synthèse de nouvelles protéines. D'autres études de stress pH-dépendant sur *Salmonella typhimurium*, montrent que le surenroulement de l'ADN est transitoirement

modifié. Des plasmides extraits de ces souches poussant en milieu acide, sont moins surenroulés négativement que ceux issus des mêmes souches poussant en milieu basique (Karem et Foster, 1993).

Dans la plupart de ces études, aucune preuve directe de l'influence du surenroulement sur l'expression génique n'a été fournie. D'un autre côté, la régulation via les facteurs sigma de l'expression des gènes pendant les stress est bien connue. Plusieurs facteurs  $\sigma$  de stress sont connus : le facteur  $\sigma_{32}$  codé par *rpoH* intervient dans la réponse aux stress de haute température, le facteur  $\sigma_E$  intervient dans la réponse au stress oxydatif et de haute température, et le facteur  $\sigma_S$  codé par *rpoS* est exprimé en phase stationnaire et dans les stress au peroxyde d'hydrogène.

## 5.6 La topoisomérase I dans la réponse aux stress

La régulation de *topA* par des facteurs de stress ainsi que plusieurs observations sur les mutants *topA* en conditions de stress, laissent supposer que la topoisomérase I est impliquée dans la réponse aux stress. Parmi les gènes régulés par  $\sigma_{32}$  et  $\sigma_S$ , on retrouve le gène de *topA* qui code pour la topoisomérase I. La transcription de *topA* a lieu à partir de 4 promoteurs P1, P2, Px1 et P4 (Rui et Tse-Dinh, 2002). P2 et P4, sont reconnus par sigma 70, un facteur abondamment exprimé en phase exponentiel, durant la croissance, alors que P1 et Px1 sont respectivement reconnus par sigma 32 (Lesley et al., 1990) et sigma S (Qi et al., 1997). Le niveau d'expression de la topoisomérase I est maintenu constant grâce à une régulation au niveau des promoteurs de *topA* (Qi et al., 1997). Le passage de la phase exponentielle vers la phase stationnaire est suivie de l'augmentation de la transcription à Px1 et de la diminution de la transcription à P4. De même lors de la réponse aux hautes températures (Qi et al., 1996), P1 prend le relais sur P2 et P4. L'expression de la topoisomérase I est également importante dans la réponse induite au stress oxydatif (Tse-Dinh, 2000). En effet la protéine FIS induit la transcription de *topA* à partir de P1 (Weinstein-Fisher et al., 2000).

L'absence de la topoisomérase I rend également les cellules très sensibles aux stress de hautes températures (Qi et *al.*, 1999) et aux stress oxydatifs (Tse-Dinh, 2000). Durant ces stress, la topoisomérase I semble prévenir la formation de R-loops, comme le suggère une étude récente dans laquelle la surproduction de la RNase H, permet l'expression de facteurs de stress et améliore la survie des cellules *topA*<sup>-</sup> (Cheng et *al.*, 2003a).



## 6 ARTICLE

**« La surproduction de la RNase H est nécessaire pour la synthèse d'ARN pleine longueur en absence de la topoisomérase I » par Baaklini et al., (2003).**

### Résumé

Il est bien connu depuis un certain temps, que les souches d'*Escherichia coli* dépourvues de topoisomérase I (mutant *topA* nul) ne poussent pas. Parce que des mutations dans la gyrase qui diminuent son activité, et par conséquent le niveau de surenroulement de l'ADN, compensent la perte de *topA*, il a été considéré que l'excès du surenroulement négatif est impliqué, d'une manière ou d'une autre, dans l'inhibition de la croissance de mutants *topA* nuls. Cependant, la manière dont cet excès de surenroulement négatif inhibe la croissance est restée inconnue. Dans ce papier, nous avons étudié l'effet de la réactivation de la gyrase, sur la physiologie d'un mutant *topA* nul en croissance. Nous avons observé que la croissance s'arrête immédiatement après la réactivation de la gyrase, et ceci malgré que les ribosomes soient toujours fonctionnels. Des analyses par Northern Blot de deux gènes, *lacZ* et *crp*, révèlent que les cellules ont des difficultés à accumuler des ARNm pleines longueurs, à moins que la RNase H, une enzyme qui dégrade la partie ARN d'un hybride ARN-ADN, ne soit surproduite. De façon intéressante, des phénotypes similaires, cependant moins sévères, sont également retrouvés quand des souches qui ne possèdent pas la RNase H sont soumises aux mêmes traitements. L'ensemble de nos résultats suggère que la formation de R-loops favorisée par l'excès du surenroulement négatif, aurait pour effet d'inhiber la transcription.

**RNase HI overproduction is required for efficient full-length RNA synthesis in the absence of topoisomerase I in *Escherichia coli*.**

Imad Baaklini<sup>1</sup>, Fabien Rallu<sup>1</sup>, Chadi Hraiky<sup>1</sup> and Marc Drolet<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, C.P. 6128,  
Succ. Centre-ville, Montréal, P. Québec, Canada, H3C 3J7,

<sup>2</sup>Corresponding author



## **6.1 Summary**

It has been known for a long time that *Escherichia coli* cells deprived of topoisomerase I (*topA* null mutants) do not grow. Since mutations reducing DNA gyrase activity and, as a consequence, negative supercoiling, occur to compensate for the loss of *topA* function, it has been assumed that excessive negative supercoiling is somehow involved in the growth inhibition of *topA* null mutants. However, how excess negative supercoiling inhibits growth is still unknown. In the present paper, we have studied the effects of gyrase reactivation on the physiology of actively growing *topA* null cells. We found that growth immediately ceases upon gyrase reactivation, despite the fact that ribosomes are still functional. Northern blot analysis of two genes, *lacZ* and *crp*, shows that the cells have a significantly reduced ability to accumulate full length mRNAs unless RNase HI, an enzyme which degrades the RNA portion of an R-loop, is overproduced. Interestingly, similar phenotypes, though less severe, are also seen when bacterial cells lacking RNase HI are grown and treated in the same way. All together our results suggest that excess negative supercoiling promotes the formation of R-loops, which, in turn, inhibit transcription.

## 6.2 Introduction

DNA topoisomerase I, encoded by *topA*, is the enzyme that removes excess negative supercoiling within the chromosomal DNA of *Escherichia coli* (Wang, 1996; Champoux, 2001; Drolet *et al.*, 2003). This surplus of negative supercoiling is mostly generated by the process of transcription, in the frame of the twin-domain model (Liu and Wang, 1987; Massé and Drolet, 1999a). Indeed, transcription generates negative and positive supercoiling, respectively behind and ahead of the moving RNA polymerase. The negative supercoiling is removed by DNA topoisomerase I, whereas DNA gyrase eliminates the positive one. One consequence of transcription-induced negative supercoiling is R-loop formation (Massé and Drolet, 1999b), a structure in which the nascent RNA hybridizes with the template strand, leaving the non-template strand single-stranded. R-loop formation has been revealed both *in vitro* and *in vivo*, in the absence of DNA topoisomerase I, but in the presence of active DNA gyrase (Phoenix *et al.*, 1997; Massé *et al.*, 1997; Massé and Drolet, 1999b). R-loops inhibit growth, since the overproduction of RNase HI, an enzyme which degrades the RNA moiety of an R-loop, partially corrects the grow problem of *topA* null mutants (Drolet *et al.*, 1995). The fact that *topA* null mutants do not growth has been known for a long time (DiNardo *et al.*, 1982). Indeed, *topA* null mutants that were initially shown to grow relatively well were later found to carry *gyrA* or *gyrB* mutations, reducing their chromosomal negative supercoiling level below that of wild-type cells (Pruss *et al.*, 1982). When *topA* null alleles were tentatively transferred by transduction with P1 phage to wild-type cells, only few *topA* null transductants could be obtained after one week of incubation (DiNardo *et al.*, 1982 and unpublished results). Upon restreaking, they were found to form colonies of regular size after only one day, indicating the presence of compensatory mutations. These results demonstrate that *topA* null mutants grow extremely slowly with a constant selective pressure for the acquisition of compensatory mutations. However, why *topA* mutations are bacteriostatic and hence, why excessive negative supercoiling strongly inhibits growth is still not known. Is growth inhibition related to gene expression, DNA replication or genome instability? If it is related to gene expression, is this a general effect?

As mentioned above, R-loop formation seems to be involved, at least to some extent, in the growth inhibition of *topA* null mutants (Drolet *et al.*, 1995). We have recently presented evidence that rRNA synthesis is partially inhibited in *topA* null mutants due to R-loop formation (Hraiky *et al.*, 2000). Of course, this finding may explain, at least in part, why *topA* null mutations are bacteriostatic. The *topA* null strain that was used to demonstrate the inhibition of rRNA synthesis carries a *gyrB*(Ts) allele allowing it to grow at 37<sup>0</sup>C but not at 28<sup>0</sup>C, a temperature at which DNA gyrase is reactivated. In the present study, we have characterized the physiological response following the transfer of such cells to the non-permissive temperature, in order to better understand why *topA* null mutations inhibit growth. Our results indicate that gene expression is largely impaired in the absence of topoisomerase I, due to difficulty in accumulating full-length RNAs, most likely because of R-loops.

### 6.3 Results

*The growth of topA null gyrB(Ts) cells is immediately inhibited upon transferring them to a non-permissive temperature.*

The *topA* null strain we used contains a *gyrB*(Ts) allele allowing it to grow at 37°C, because gyrase activity is then low enough for the chromosomal supercoiling level to be below that of wild-type cells (Drolet *et al.*, 1995). Upon transferring the cells to 28°C, DNA gyrase is almost instantaneously reactivated (Steck and Drlica, 1984) and the chromosomal supercoiling level, as indicated by plasmid DNA, becomes higher than that of wild-type cells within two minutes following the transfer (Drolet *et al.*, 1995; unpublished results). Figure 1a (top panel) shows that under these conditions, cell growth immediately and almost completely ceases unless RNase HI is overproduced. In fact, RNase HI overproduction allows the cells to grow almost as well as the isogenic *topA*<sup>+</sup> *gyrB*(Ts) cells. The growth arrest of the *topA* null *gyrB*(Ts) strain is not permanent and after a while, growth eventually resumes, albeit at a much lower rate than that of the other strains. This result suggests that it is not only the reactivation of gyrase that is problematic, but also the temperature downshift in itself, which apparently constitutes a stress.

If a transfer from 37 to 28°C is also stressful for *topA*<sup>+</sup> strains, it is not easily seen by the growth curve presented in Fig. 1a. To better address this issue we have measured the ability of the cells to produce  $\beta$ -galactosidase just before and immediately following the downshift and throughout growth at 28°C, by inducing *lac* operon expression with IPTG for 15 minutes at each time point (Fig. 1b; bottom panel). It can be seen that the  $\beta$ -galactosidase activity level for the wild-type cells drops by almost five-fold following the temperature downshift from 37 to 28°C, despite the fact that the growth rate is lower by only two-fold at 28°C (data not shown). This difference is probably underestimated since within this 15 minute IPTG-induction time,  $\beta$ -galactosidase activity has probably started to raise, as its value is higher by two-fold for the next time point. Together, the rapid drop in the level of  $\beta$ -galactosidase activity following the temperature downshift and its subsequent increase, suggest that the cells have experienced a stress. A similar pattern of

$\beta$ -galactosidase expression is also observed for the *gyrB(Ts) topA*<sup>+</sup> strain (squares). For the *gyrB(Ts) topA* null strain, the level of  $\beta$ -galactosidase activity immediately drops by more than sixty-fold, to almost zero, and remains very low throughout time at 28<sup>o</sup>C. RNase HI overproduction significantly corrects this problem, without, however, restoring the  $\beta$ -galactosidase activity level to that of the *topA*<sup>+</sup> strains. Interestingly,  $\beta$ -galactosidase activity is lower by more than 7-fold in a strain almost completely devoid of RNase HI activity (compare wild-type with *rnhA224*). Since  $\beta$ -galactosidase activity in this *rnhA224* strain is only 2-fold lower than that of the wild-type strain before the downshift, it strongly suggests that such a temperature drop stimulates the formation of inhibitory R-loops. This is consistent with the results of our previous studies with *topA* null mutants suggesting that R-loop formation is stimulated at low temperatures (Massé and Drolet, 1999c).

Figure 2 shows the results of pulse-labelling experiments with [<sup>3</sup>H]-thymidine to follow the rate of DNA synthesis after a temperature downshift. It can be seen that the rate of DNA synthesis gradually decreases in the *topA* null *gyrB(Ts)* strain. It is known that about 40 minutes are required to fully replicate the chromosome (Helmstetter, 1996). This corresponds to the time interval between the higher rate of DNA synthesis and the lower one for the *topA* null *gyrB(Ts)* strain. Moreover, by adding the protein synthesis inhibitor chloramphenicol, the drop in the rate of DNA synthesis throughout time for this strain perfectly matches the one observed in the absence of chloramphenicol (not shown). Together, these results indicate that, although replication elongation seems to be normal in the *topA* null mutant, initiation is clearly inhibited. This is consistent with the fact that protein synthesis is inhibited in the *topA* null mutant, and that initiation of replication requires *de novo* protein synthesis. RNase H overproduction corrects this problem in the *topA* null mutant (not shown).

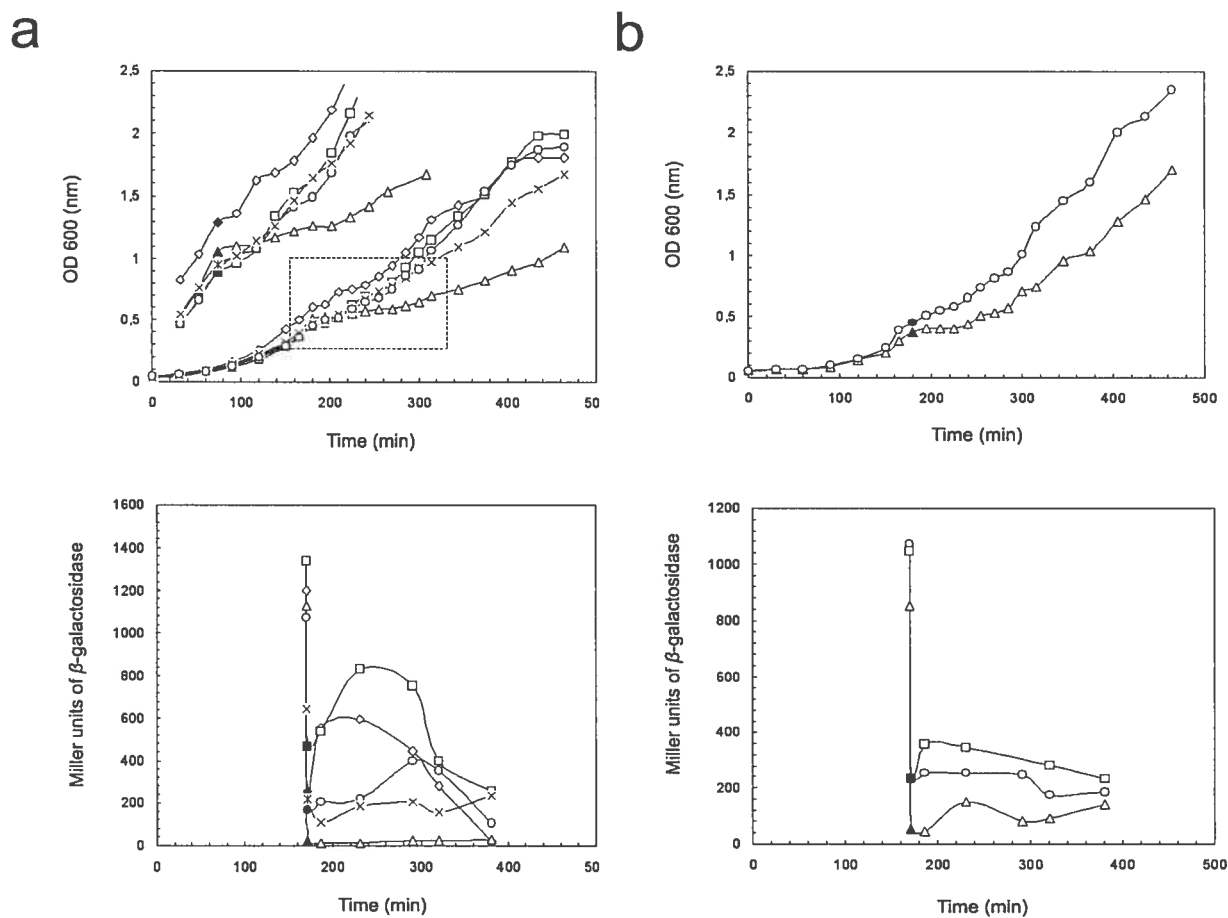
*The topA null gyrB(Ts) cells are unable to induce the stringent response at the non-permissive temperature.*

We have previously shown that rRNA synthesis is immediately and significantly reduced due to R-loop formation upon transferring the *topA* null cells to 28<sup>o</sup>C (Hraiky *et al.*, 2000; Raymond *et al.*, unpublished results). Despite the fact that a reduction in

Table 1: *Escherichia coli* strains used in this study.

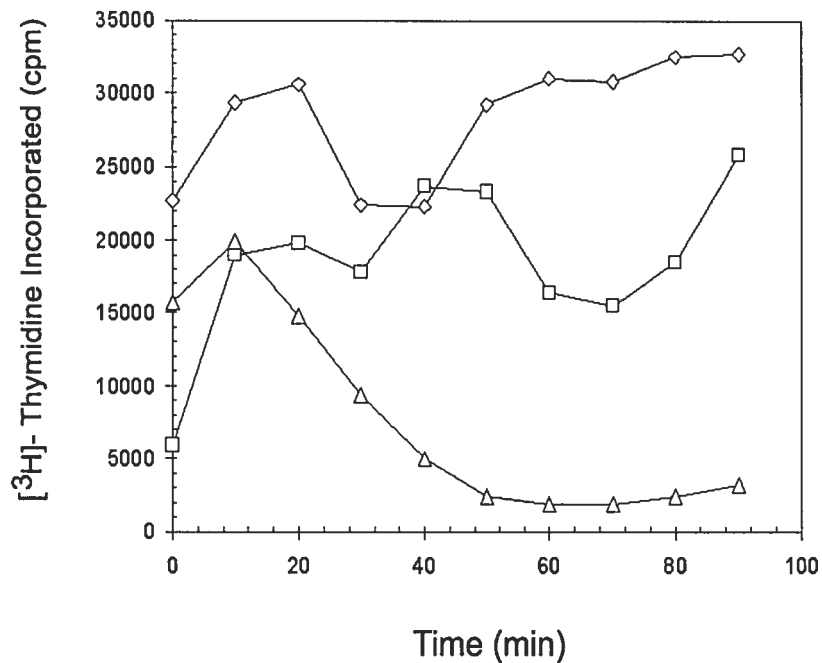
Strain	Genotype	Source or Ref.
AQ634	<i>ilv metB his-29 trpA9605 pro thyA deoB</i> (or <i>C</i> )	Ogawa <i>et al.</i> , 1984
AQ666	AQ634, <i>rnhA224</i>	Ogawa <i>et al.</i> , 1984
MA249	AQ634, <i>gyrB221</i> (cou <sup>R</sup> ) <i>gyrB203</i> (Ts) <i>zie-3163::Tn10kan</i>	Hraiky <i>et al.</i> , 2000
MA251	MA249, <i>topA20::Tn10</i>	Hraiky <i>et al.</i> , 2000
RFM445	<i>rpsL galK2 gyrB221</i> (cou <sup>R</sup> ) <i>gyrB203</i> (Ts) $\Delta$ <i>lac74</i>	Drolet <i>et al.</i> , 995
RFM480	<i>rpsL galK2 gyrB221</i> (cou <sup>R</sup> ) <i>gyrB203</i> (Ts) <i>topA20::Tn10</i> $\Delta$ <i>lac74</i>	Drolet <i>et al.</i> , 1995
CA88224.1	Hfr ( <i>valS</i> -<- <i>attP4</i> ) <i>lacZp-4105</i> (UV5) <i>lacZp-4037</i> (L37) $\lambda$ <i>relA1 spoT1 thi-1</i>	Arditti <i>et al.</i> , 1968
IB97	RFM445, <i>lacZp-4105</i> (UV5) <i>lacZp-4037</i> (L37)	This work
IB96	RFM480, <i>lacZp-4105</i> (UV5) <i>lacZp-4037</i> (L37)	This work





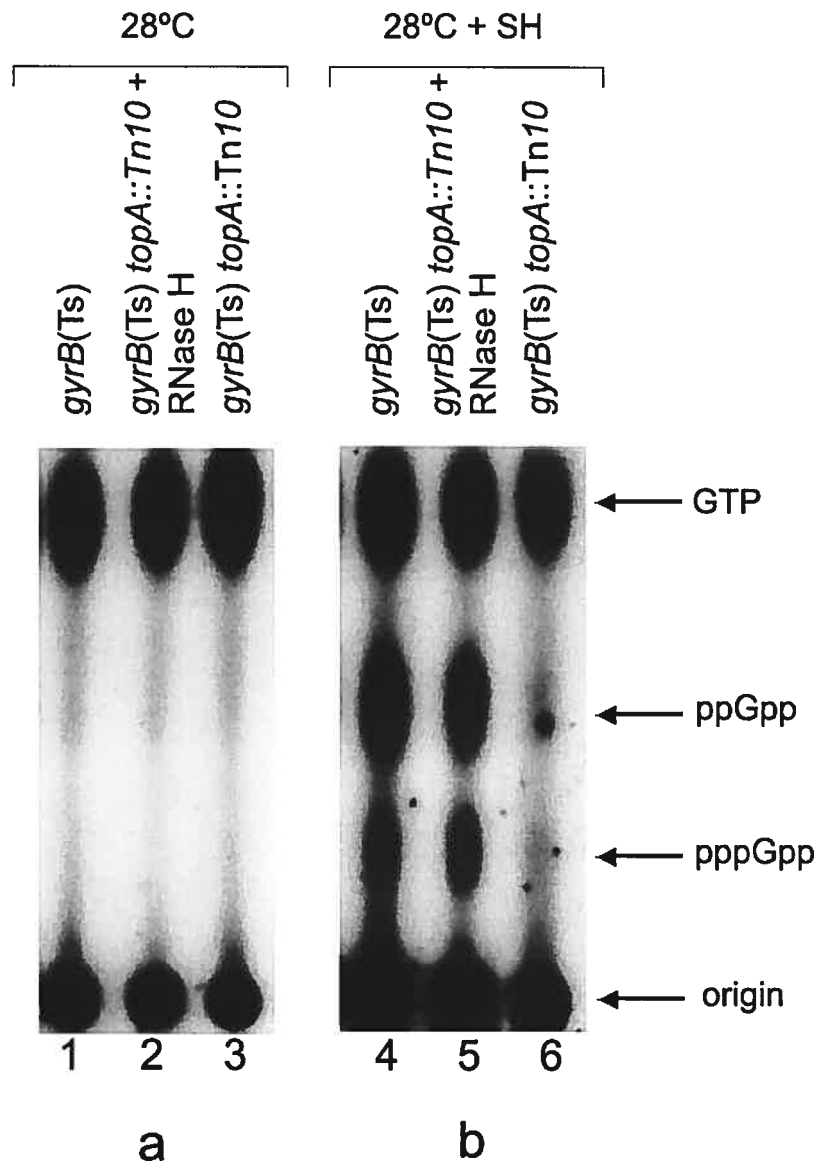
**Figure 1. The effect of gyrase reactivation by a temperature downshift on the growth and b-galactosidase activity of a *topA* null mutant.**

Top panels: cell growth in VB Casa was monitored by measuring the OD<sub>600</sub> with a Shimadzu spectrophotometer (model UV160U) through time (min) at 37°C and after the downshift at 28°C. Filled symbols correspond to the time of the transfer from 37 to 28°C (when cell densities reached an OD<sub>600</sub> of about 0.45). Bottom panels: Samples from growing cells (top panel) were taken at 37°C just before the transfer and immediately after being transferred to 28°C (filled symbols), and β-galactosidase synthesis was induced by adding IPTG (1 mM) for 15 min at the temperature from which the samples were taken. Thereafter samples were taken at various times at 28°C and β-galactosidase synthesis was induced by adding IPTG (1 mM) for 15 min. b-galactosidase activity was measured as described in material and methods. a) *lac* expression is under the control of the wild-type *lac* promoter. AQ634 (wild-type), ◇; MA249 (AQ634 *gyrB*(Ts)), □; MA251 + RNase H (*gyrB*(Ts) *topA20*::Tn10 + pSK760), ○; MA251 (*gyrB*(Ts) *topA20*::Tn10), Δ and AQ666 (*rnhA*), ×. b) *lac* expression is under the control of the *lacUV5* promoter. IB97 (*gyrB*(Ts)), □; IB96 + RNase H (*gyrB*(Ts) *topA20*::Tn10 + pSK760), ○ and IB96 (*gyrB*(Ts) *topA20*::Tn10 + pSK762c), Δ.



**Figure 2. The effect of gyrase reactivation by a temperature downshift on the DNA synthesis rate in a *topA* null mutant.**

The DNA synthesis rate following the transfer of the cells from 37 to 28°C was measured by pulse-labeling (two min.) with [<sup>3</sup>H]-thymidine every ten min., as described in material and methods. MA249 (AQ634 *gyrB*(Ts)), □; AQ634 (wild-type), ◇ and MA251 (*gyrB*(Ts) *topA20::Tn10*), Δ.



**Figure 3. The effect of gyrase reactivation by a temperature downshift on the ability of the *topA* null mutant to induce RelA-dependent ppGpp synthesis.**

ppGpp levels at 28°C following the addition or not of serine hydroxamate (SH) were measured as described in material and methods. RNase H indicates that the cells also carry pEM001.

ribosome production will eventually cause the protein synthesis rate to drop, this effect should be illustrated by a gradual decrease in growth rate following the transfer to 28°C. Indeed, there are no obvious reasons why the ribosomes that were made in normal quantities at 37°C, should not be active at 28°C in the *topA* null mutant (see below). The immediate growth arrest can best be explained by the lack of an unstable component involved in protein synthesis.

The synthesis of ppGpp, the small effector of the stringent response, can rapidly be induced by various stresses in *E. coli* (Chatterji and Ojha, 2001). The cellular target of ppGpp is RNA polymerase, and an increase in its synthesis rapidly inhibits the production of stable RNAs. An inhibition of protein synthesis and, as a consequence, the inhibition of DNA replication initiation, that is apparently due to a reduction of mRNA synthesis at the level of transcription elongation, is also observed when ppGpp levels increase sufficiently (Svitil *et al.*, 1993; Sorensen *et al.*, 1994; Sorensen, 2001). Fig. 3a shows the result of an experiment in which ppGpp levels were measured in various strains incubated at 28°C. In all cases, including the *topA* null *gyrB(Ts)* strain that does not overproduce RNase HI, ppGpp was barely detectable, indicating the absence of a ppGpp-responsive stress. Next, we measured the capacity of the strains to induce *relA*-dependent ppGpp synthesis at 28°C, which requires the presence of uncharged tRNA on ribosomes that are actively translating mRNAs. Fig. 3b shows that the *topA* null *gyrB(Ts)* strain is very inefficient in inducing ppGpp synthesis via this pathway, unless RNase HI is overproduced (compare lanes 5 and 6). We found that the *topA* null *gyrB(Ts)* mutant is as efficient as the other strains in inducing *relA*-dependent ppGpp synthesis at 37°C (data not shown). Together with the fact that the growth of the *topA* null *gyrB(Ts)* strain immediately ceases following the temperature downshift, these results indicate that an unstable component of the translation machinery, such as mRNA (see below), is lacking, and therefore that *relA*-dependent ppGpp synthesis could not be induced.

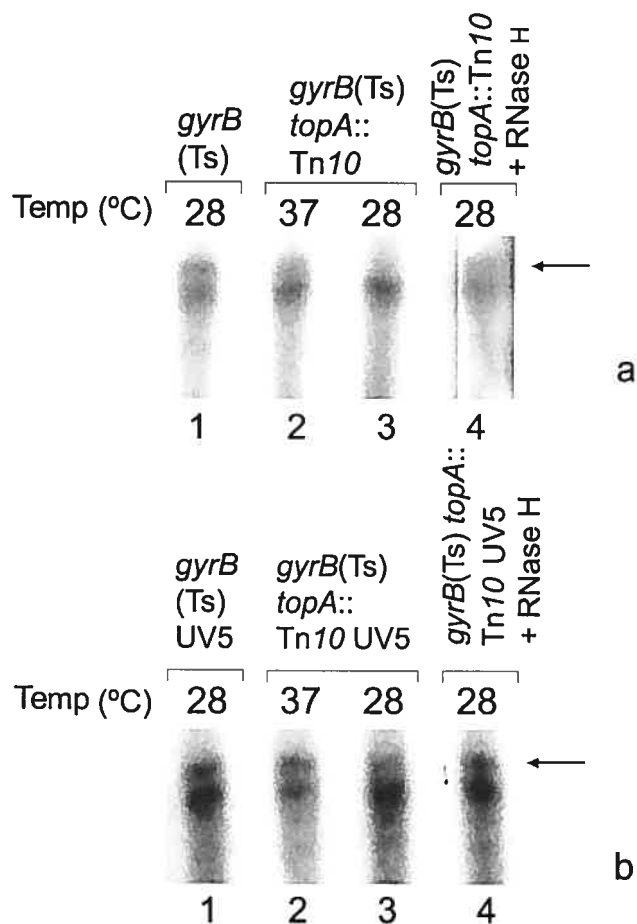
*The inhibition of  $\beta$ -galactosidase synthesis in the topA null gyrB(Ts) strain is related to both transcription initiation and elongation.*

In order to be fully active, the *lac* promoter requires the assistance of the catabolite regulator protein (CRP). We found that substituting the wild-type *lac* promoter

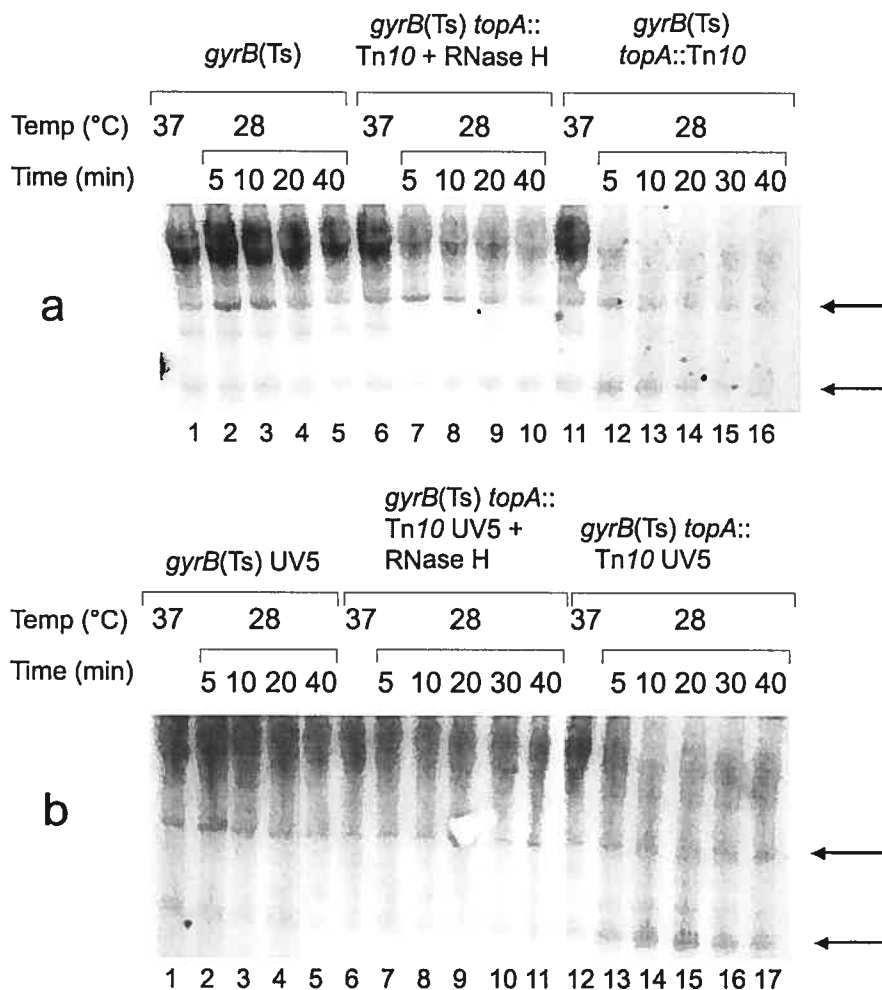
for the mutated *lacUV5* one, which is CRP-independent, has no effect in the *topA* null strain overproducing RNase HI, whereas it increases  $\beta$ -galactosidase activity by almost 10-fold in the *topA* null strain not overproducing RNase HI (compare the *topA* null strains in Fig. 1a and 1b, bottom panel). This result indicates that the lack of CRP synthesis can explain the low level of  $\beta$ -galactosidase activity in the *topA* null strain (see below). However, as this activity is still about 5-fold lower than in the strain overproducing RNase H, the lack of CRP cannot fully explain it.

We next performed primer extension experiments to evaluate both wild-type *lac* and mutant *lacUV5* promoters activity before and after the temperature downshift. The results presented in Fig. 4a demonstrate the very low activity of the wild-type *lac* promoter in the *topA* null mutant at 28°C. However, the *lacUV5* promoter is almost as active in the *topA* null strain as it is in the other strains at this temperature (Fig. 4b). These results support the hypothesis that CRP is lacking in the *topA* null mutant, but it does not explain why  $\beta$ -galactosidase activity is still 5-fold lower in the *topA* null strain carrying the *lacUV5* promoter when RNase H is not overproduced. To further address this issue, we have performed northern blot experiment with a probe hybridizing to the 5' region of *lacZ* (see Materials and methods). The RNA samples were resolved by electrophoresis in a denaturing polyacrylamide gel. Such an experimental design allows the detection of short RNA products.

Fig. 5a shows the result of an experiment with RNA extracted from strains carrying the wild-type *lac* promoter. At 37°C, the pattern of bands hybridizing to the *lacZ* probe is both qualitatively and quantitatively identical among the various strains used in this study (lanes 1, 6 and 11). However, at 28°C, the *topA* null strain not overproducing RNase HI produces much less full-length *lac* mRNA. It is also evident that proportionally more of the short RNA products accumulate in this strain (see the arrows pointing to these short RNAs). The short RNAs pointed by arrows may represent products of RNase E cleavage, a nuclease known to be involved in *lac* mRNA decay, of either full-length or simply incomplete mRNA chains. In addition, the accumulation of multiple RNAs of heterogeneous sizes (a “smear” appearance) is clearly more visible in the *topA* null strain not overproducing RNase HI at 28°C (for example compare lane 8 with lane 13). The results presented in Fig. 5b demonstrate that the *topA* null mutant not overproducing



**Figure 4. Primer extension analysis to measure *lac* expression in a *topA* null mutant following a temperature downshift to reactivate gyrase.** Cells were grown in VB casa at 37°C to an OD<sub>600</sub> of 0.5 and IPTG was added to 1 mM final. After 5 min., an aliquot of the cell cultures was taken (for the *topA* null cells only) for RNA extraction and the remaining of the cultures were transferred to 28°C. Five, 10, 20 and 40 min. later, aliquots of the cell cultures were taken for RNA extraction. 10 μg of RNA (time 20 min. for the 28°C samples) were used for primer extension analysis with the *lac* primer as described in material and methods. a) strains carrying the wild-type *lac* promoter. b) strains carrying the *lacUV5* promoter. Arrows point to initiation start sites. +RNase H indicates that the cells also carry pSK760. As the band just below the *lac* promoter signal is also present in the same amount when IPTG was not added (not shown), it is a non-specific signal.



**Figure 5. Northern blot analysis in polyacrylamide gels to detect shorter than full-length *lac* mRNA chains in a *topA* null mutant following a temperature downshift to reactivate gyrase.** 30  $\mu$ g of the RNA samples prepared during the experiment described in Fig. 4, were used for northern blots on polyacrylamide gels with the *lacZ* probe as described in material and methods. a) strains carrying the wild-type *lac* promoter. b) strains carrying the *lacUV5* promoter. Arrows point to bands corresponding to shorter than full-length RNA chains. +RNase H indicates that the cells also carry pSK760.

RNase HI accumulates the differently sized *lac* RNA products in the same proportion, whether transcription originates from the wild-type *lac* or mutated *lacUV5* promoter. The only notable difference is the total amount of RNA, which is clearly greater for the *lacUV5* promoter. This is consistent with the results of primer extension and  $\beta$ -galactosidase assays (see above), and further supports the fact that the availability of full-length RNAs, but not ribosomes, is the limiting factor for protein synthesis in the *topA* null mutant. As we found no evidence of full-length mRNA being less stable in the *topA* null strain (indeed, we often found the opposite to be true; data not shown and see Discussion), we attribute the higher ratio of short-length to full-length RNAs to a transcription elongation defect, which is consistent with its correction by RNase HI overproduction.

***topA* null *gyrB*(Ts) cells have reduced abilities to accumulate full-length *crp* mRNA at the non-permissive temperature.**

Our results of *lacZ* expression from wild-type *lac* and mutated *lacUV5* promoters strongly suggest that *crp* expression might be perturbed in the *topA* null strain when RNase HI is not overproduced. To further test this hypothesis, we have performed northern blot experiments with a probe hybridizing to the 5' region of *crp* thus allowing the detection of transcripts originating from either P1 or P2 promoter (see Materials and methods). Fig. 6a demonstrates that *crp* mRNA levels dramatically drop in the *topA* null cells not overproducing RNase HI, following the temperature downshift, and remains low throughout time. However, despite its low level, it eventually slightly raises 40 min. after the downshift (compare lanes 19, 20 and 21). In the other strains, *crp* mRNA remains as abundant as it is at 37<sup>0</sup>C with, however, a drop in these levels when the cells enter the stationary phase of growth (lanes 7 and 14, time 180 min). We next performed primer extension experiments to evaluate P1 and P2 promoter activities, before and 20 min. after the downshift. Fig. 6b shows the results of this experiment which fails to detect any significant differences in *crp* expression from either P1 or P2 promoter, in all the strains. This is highly reminiscent of the situation of *lacZ* from *PlacUV5*, and therefore strongly suggests that *topA* null cells have a reduced ability to accumulate full-length *crp* mRNA, at the non-permissive temperature. This hypothesis is supported by the results of a



northern blot experiment with a probe covering the 5' region of *crp*, to detect short RNAs separated in a denaturing polyacrylamide gel. Indeed, it can be seen that the *topA* null cells accumulate proportionally a larger amount of short incomplete RNA chains than the other strains at 28°C (Fig. 6c, for example, compare lanes 4, 10 and 16, time 20 min). Since this problem is corrected by RNase HI, as is the case for *lacZ*, it is likely related to transcription elongation. Further consistent with the fact that full-length mRNA is limiting for CRP synthesis, is our observation that  $\beta$ -galactosidase activity is higher and close to that originating from *PlacUV5*, when cells are grown in media without added glucose (LB and VB glycerol media), that support higher activity of *crp* promoters (data not shown).

Our primer extension studies indicate that *crp* mRNA transcription initiates at both P1 and P2 promoters for all strains used in this work. We performed additional northern blot experiments to detect short RNAs separated in a denaturing polyacrylamide gel, with a probe which specifically detects RNA initiated from P1 but not P2 (see Materials and methods). Once again, the results presented in fig. 7 clearly show that *topA* null cells not overproducing RNase HI accumulate proportionally more of the short RNAs than the other strains (for example, compare lanes 4,10 and 16, time 20 min). The accumulation of specific and sharp RNA bands delineated by a parenthesis in the *topA* null mutant (for example lane 16), is further studied in the last section of the results. By using the same approach, northern blots with 5' probes of RNA samples resolved by electrophoresis in denaturing polyacrylamide gels, *recA*, *rpoH* and *fis* mRNA synthesis is found to be similarly impaired in the *topA* null mutant (unpublished results and see below).

**Despite *fis* gene overexpression, *topA* null *gyrB*(Ts) cells have reduced abilities to accumulate full-length *fis* mRNA at the non-permissive temperature.**

Two recent studies have revealed the interplay between *crp* and *fis* gene regulation. On the one hand, Fis can repress the *crp* gene in the presence of CRP (Gonzalez-Gil *et al.*, 1998), whereas, on the other hand, CRP can either activate or repress the *fis* gene, depending on the cellular FIS concentration (Nasser *et al.*, 2001). Moreover, *fis* gene expression is subject to growth phase-dependent regulation (Ball *et*

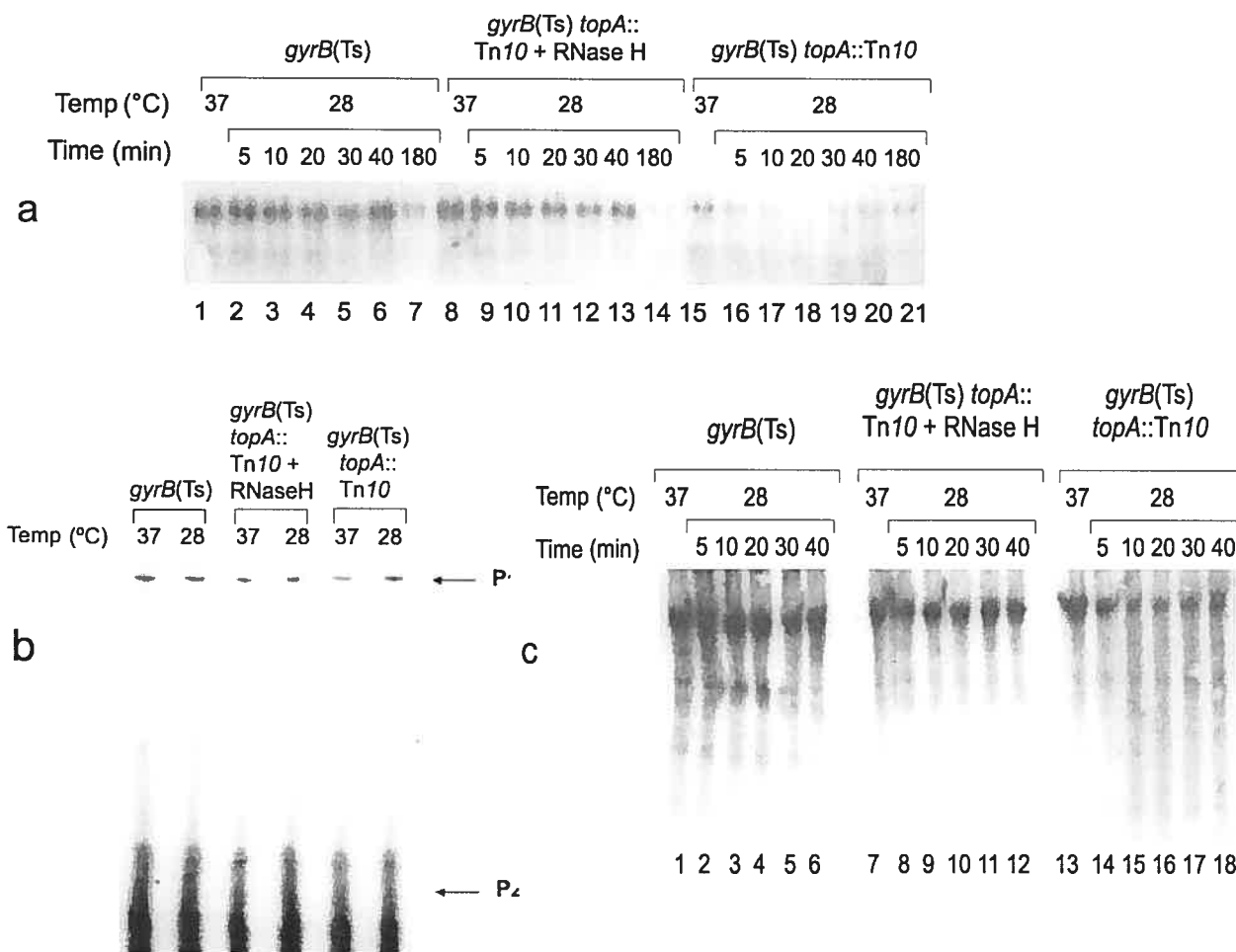
*al.*, 1992; Ninnemann *et al.*, 1992) and is sensitive to the *in vivo* DNA supercoiling state (Schneider *et al.*, 2000). Therefore, to further characterize the physiological response of *topA* null cells after gyrase reactivation by a temperature downshift, we have performed northern blot experiments, with a 5' probe, to follow *fis* expression through time. This probe hybridizes to the 5' region of ORF1 that precedes *fis*, within the dicistronic operon (see Materials and methods). The results presented in fig. 8a demonstrate that ORF1-*fis* mRNA accumulates with time following the transfer of *topA* null cells from 37 to 28°C (right panel), whereas it remains low in the isogenic *topA*<sup>+</sup> cells (left panel). ORF1-*fis* mRNA accumulation in the *topA* null cells is much less abundant when RNase HI is overproduced (middle panel). Despite the fact that negative supercoiling increases within the *topA* null cells following the temperature downshift (by roughly 15%, not shown), we rather attribute the gradual and large increase in *fis* expression in these cells to growth phase-dependent control. Indeed, according to a recent study (Schneider *et al.*, 2000), an increase in global negative supercoiling by roughly 15% above the wild-type level is not expected to significantly affect *fis* expression. Moreover, as gyrase is reactivated within 2 minutes following the temperature downshift, *fis* expression should increase almost immediately and remain at the same level throughout the time at 28°C. Clearly, it is not the case here (Fig. 8a, right panel). Therefore, we believe that the gradual and large increase in *fis* expression reflects the physiological state of the *topA* null cells following the transfer: an almost complete inhibition of both protein synthesis and DNA replication which, in turn, causes the expansion of the NTP pool. NTP availability was recently shown to be the main determinant of the growth phase-dependent control of *fis* expression (Walker and Osuna, 2002). The fact that *fis* overexpression has apparently no effect on *crp* expression in the *topA* null cells (primer extension, Fig. 6b), can best be explained by the lack of a sufficient amount of CRP protein, since FIS and CRP act together to repress *crp*.

Interestingly, not only is the accumulation of ORF1-*fis* mRNA easily seen in the *topA* null mutant, but shorter than full-length RNAs that appear immediately following the temperature downshift, are also present (Fig. 8a, right panel, the bands pointed by arrows). Overproduction of RNase HI greatly reduces the accumulation of these RNAs relative to full-length ORF1-*fis* mRNA (middle panel). These RNA species are also

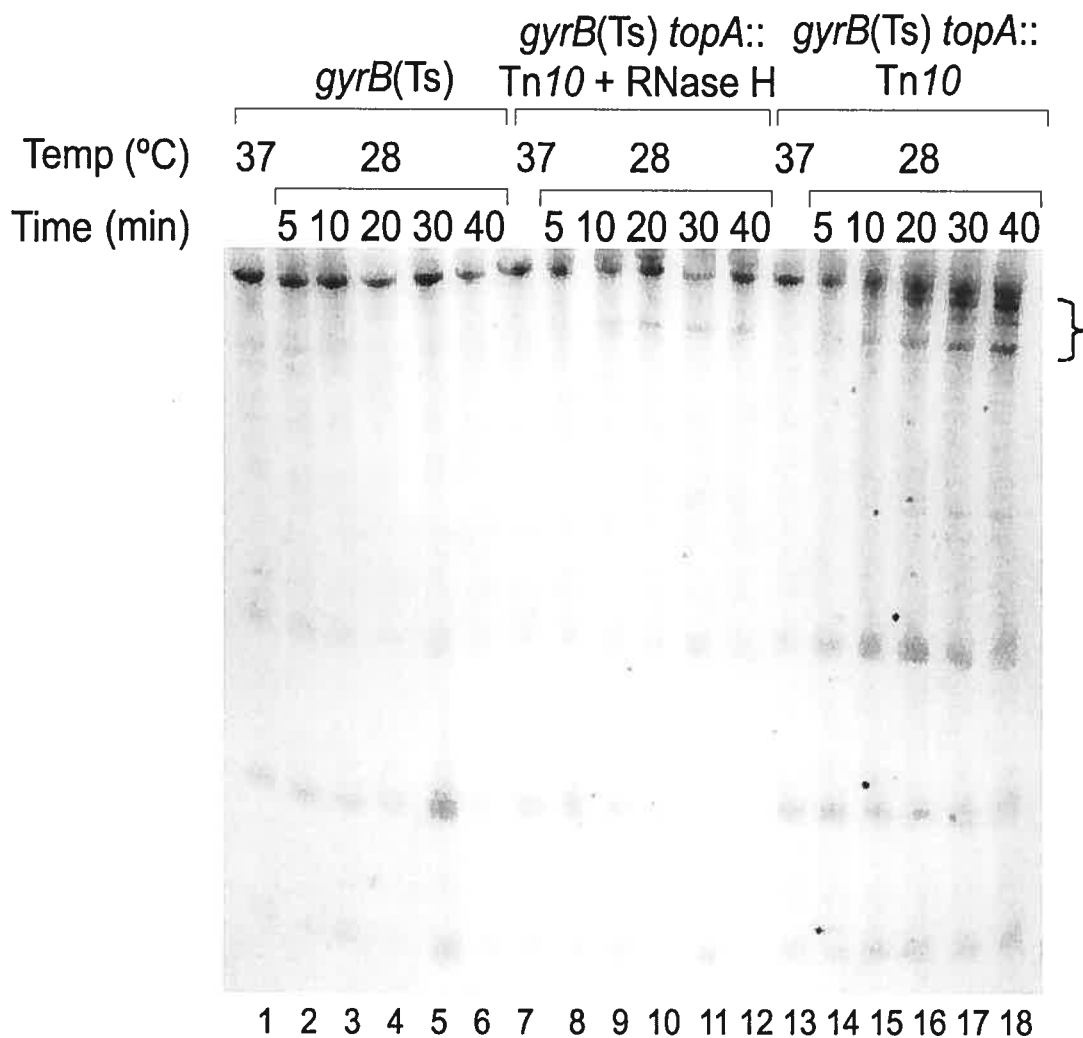
detected in the *rnhA224* mutant following the temperature downshift (Fig. 8b, right panel, the bands pointed by arrows). As shown by the result of the  $\beta$ -galactosidase assays (Fig. 1a), this observation strongly suggests that problems related to R-loops are taking place in the *rnhA224* mutant following the temperature downshift, but to a much lesser extent than in the *topA* null cells. This is consistent with the fact that RNase HI needs to be overproduced in the *topA* null mutant to correct these problems.

Fig. 8c shows the result of a northern blot experiment with a *fis* 3' probe to verify which bands among the short RNAs detected with a 5' probe, could be the products of an endonucleolytic cleavage of the full-length ORF1-*fis* mRNA. Indeed, an endonucleolytic cleavage should generate two RNA products of equivalent intensity, though the 5' one is often more rapidly degraded due to the action of 3' exoribonucleases (Nicholson, 1999). Moreover, experimental evidence has been previously published for an endonucleolytic cleavage of the dicistronic ORF1-*fis* transcript generating ~600-base and ~800-base RNAs, which respectively hybridize with a 5' and a 3' probe (Ball *et al.*, 1992). Fig. 8a, right panel, demonstrates the presence of 5 bands including the top one which corresponds to the full-length ORF1-*fis* mRNA, when RNA from the *topA* null mutant is hybridized with the 5' probe. Only two bands, including the full-length ORF1-*fis* message, are easily detected with the 3' probe (Fig. 8c, lanes 3 and 4). This result supports the presence of one endonucleolytic cleavage site within the ORF1-*fis* mRNA (Ball *et al.*, 1992), and therefore suggests that three of the four RNA species detected with the 5' probe could have been generated by premature transcription termination.

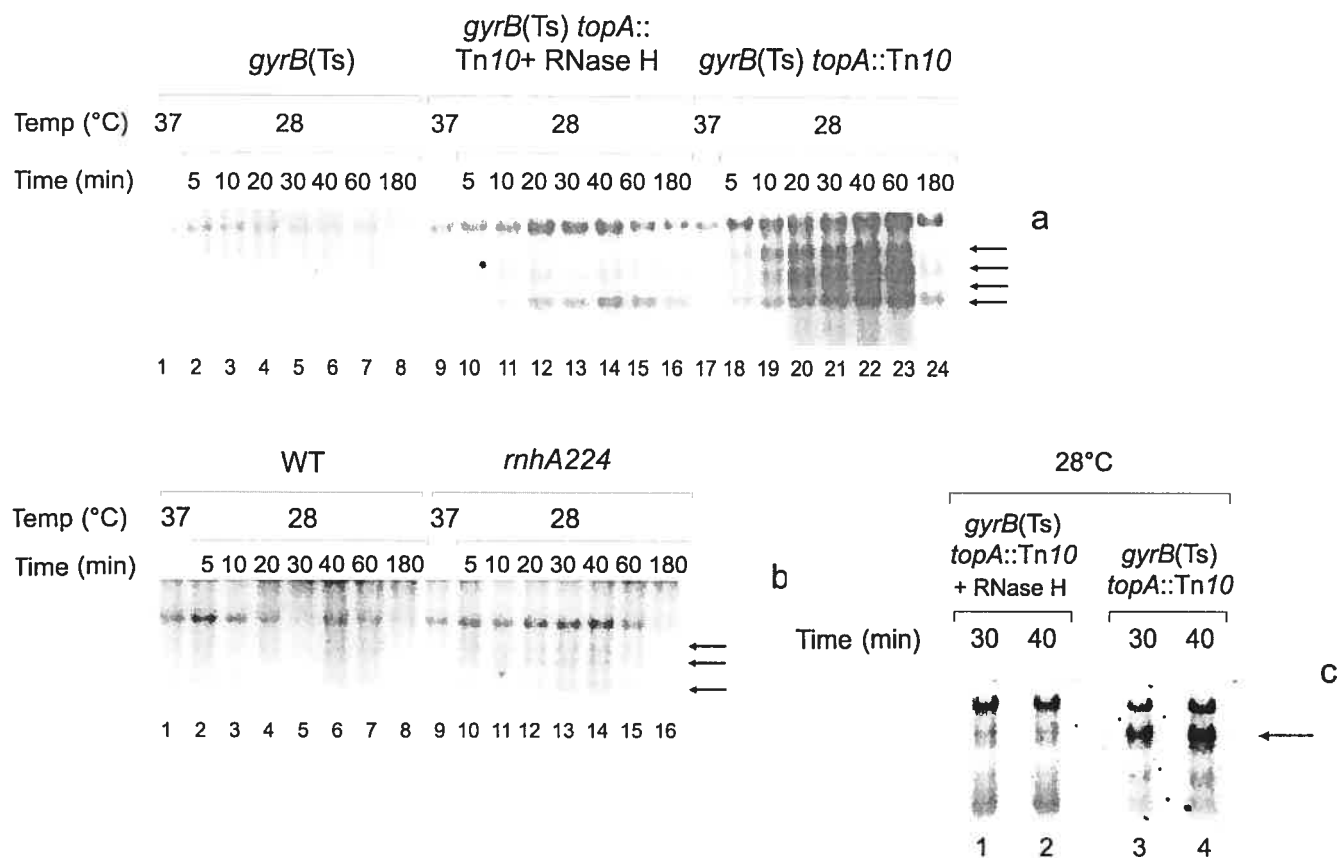
The presence of the short RNAs is also revealed by northern blot experiments following electrophoresis in denaturing polyacrylamide gels (Fig. 9, parenthesis no 1). These experiments also reveal the occurrence of much shorter RNAs (Fig. 9, parenthesis no 2), which is reminiscent to the situation of *lac* (Fig. 5) and *crp* (Fig. 6c and 7). RNase HI overproduction seems to correct this problem, though it is difficult to judge, because of the much lower levels of *fis* expression in these cells. The addition of a protein synthesis inhibitor, which allows for both the overproduction and the stabilization of ORF1-*fis* mRNA, circumvents this problem (see below).



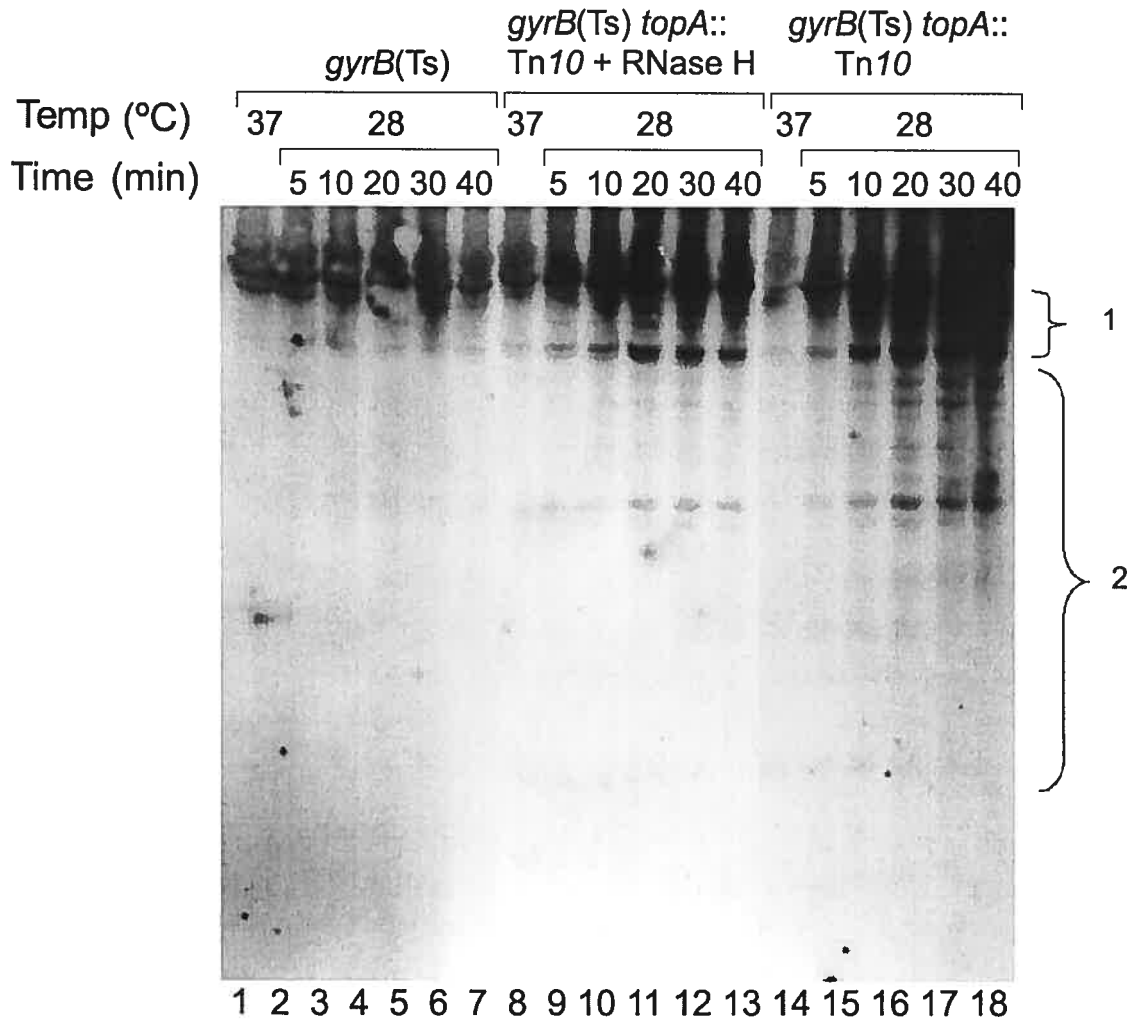
**Figure 6. *crp* expression in a *topA* null mutant following a temperature downshift to reactivate gyrase.** Cells were grown in VB casa at 37°C to an OD<sub>600</sub> of 0.5 and transferred to 28°C. An aliquot of the cells culture was taken just before the transfer for RNA extraction. Five, 10, 20, 30, 40 and 180 min. following the transfer to 28°C, aliquots of the cell cultures were taken for RNA extraction. a) 10 μg of RNA were used for northern blot analysis in an agarose gel with the CRP2 probe, to measure the level of full-length *crp* mRNA initiated from either P1 or P2 *crp* promoters. b) 10 μg of RNA (time 20 min. for the 28°C samples) were used for primer extension analysis with the CAP3 primer to measure *crp* expression from both P1 and P2 *crp* promoters (indicated by arrows). c) 30 μg of RNA were used for northern blot analysis in polyacrylamide gels with the CRP2 probe to detect shorter than full-length *crp* mRNA chains initiated from either P1 or P2 promoters. +RNase H indicates that the cells also carry pSK760.



**Figure 7.** Northern blot analysis in a polyacrylamide gel to detect shorter than full-length *crp* mRNA chains initiated from the P1 promoter in a *topA* null mutant following a temperature downshift to reactivate gyrase. Cells were grown and RNA extracted and analyzed as described in Fig. 6c, except that the CRP1 probe was used to specifically detect the mRNAs initiated at P1. The parenthesis indicates specific sharp RNA bands detected in the *topA* null mutant. +RNase H indicates that the cells also carry pSK760.



**Figure 8.** *fis* expression in a *topA* null mutant following a temperature downshift to reactivate gyrase. Cells were grown and RNA extracted as described in Fig. 6. a) and b) 10  $\mu$ g of RNA were used for northern blot analysis in an agarose gel with the ORF1FIS probe, to measure the level of full-length ORF1-*fis* mRNA. WT: wild-type strain. +RNase H indicates that the cells also carry pSK760. c) is as a) except that the FIS 3' probe was used to detect processed *fis* mRNA products. Arrows point to bands corresponding to shorter than full-length RNA chains.



**Figure 9.** Northern blot analysis in polyacrylamide gels to detect shorter than full-length *fis* mRNA chains in a *topA* null mutant following a temperature downshift to reactivate gyrase. Cells were grown and RNA extracted and analyzed as described in Fig. 6c, except that the ORF1FIS probe was used to detect ORF1-*fis* mRNAs. The parentheses indicate specific sharp RNA bands mostly detected in the *topA* null mutant. +RNase H indicates that the cells also carry pSK760.

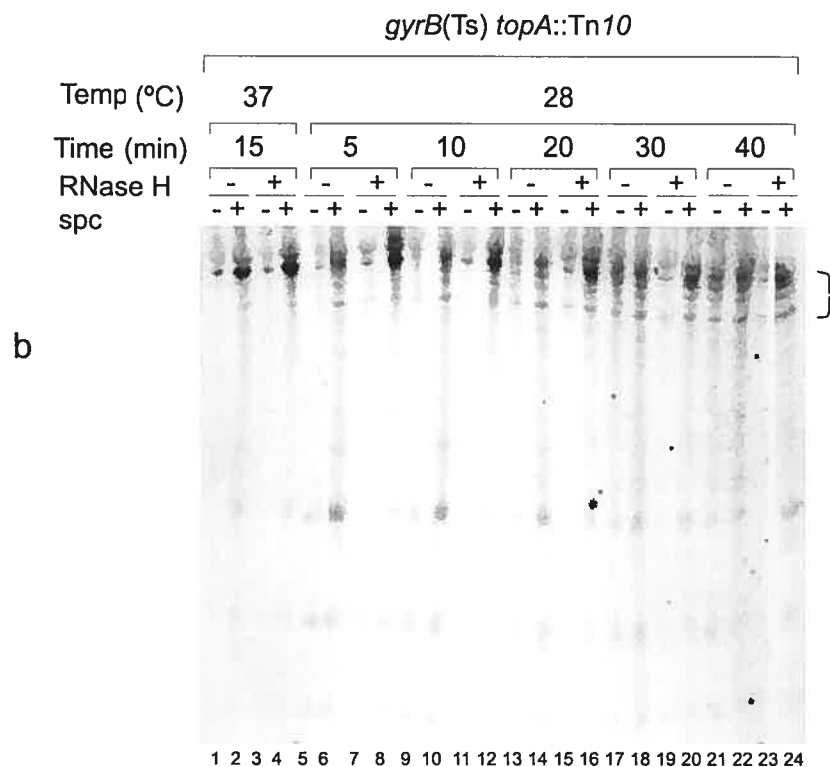
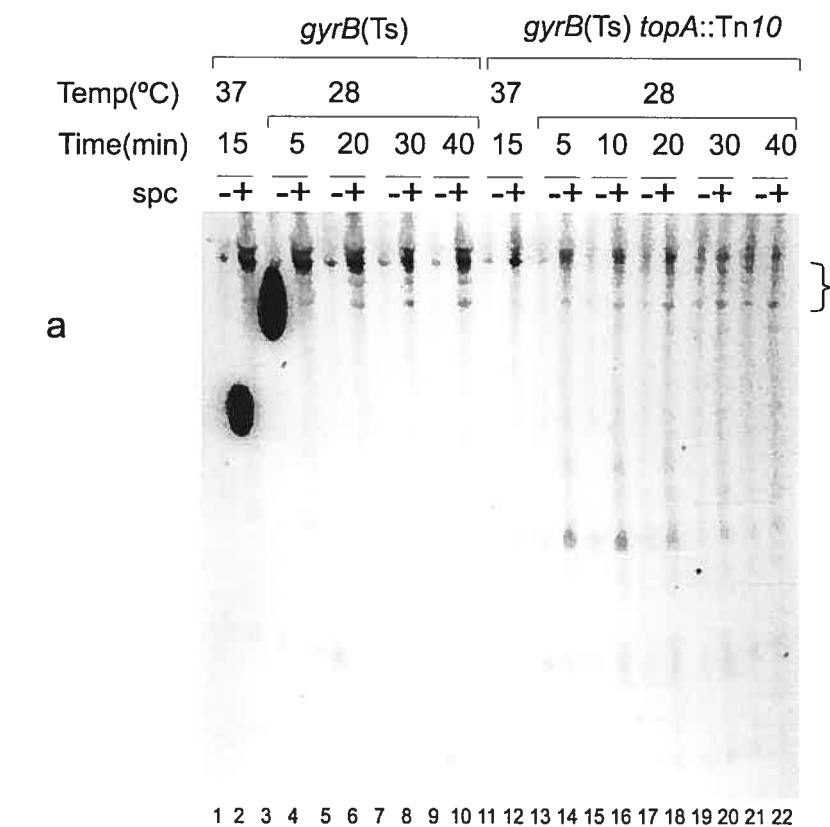
### ***The RNase HI effect does not involve de novo protein synthesis***

In the next series of experiments, the cells were exposed to a protein synthesis inhibitor before a temperature downshift and RNA was extracted throughout time. With such an experimental design, it is possible to verify if the RNase HI effect requires *de novo* protein synthesis. More experimental evidence for a direct effect of RNase H on the expression of genes analysed in the present study, can therefore be gained. Moreover, since an inhibition of protein synthesis, as is the case in the *topA* null mutant after the temperature downshift, can cause both mRNA overproduction, when gene expression is autoregulated, and accumulation due to stabilization (Lopez *et al.*, 1998), such experiments should allow for a more precise characterization of the RNase HI effect.

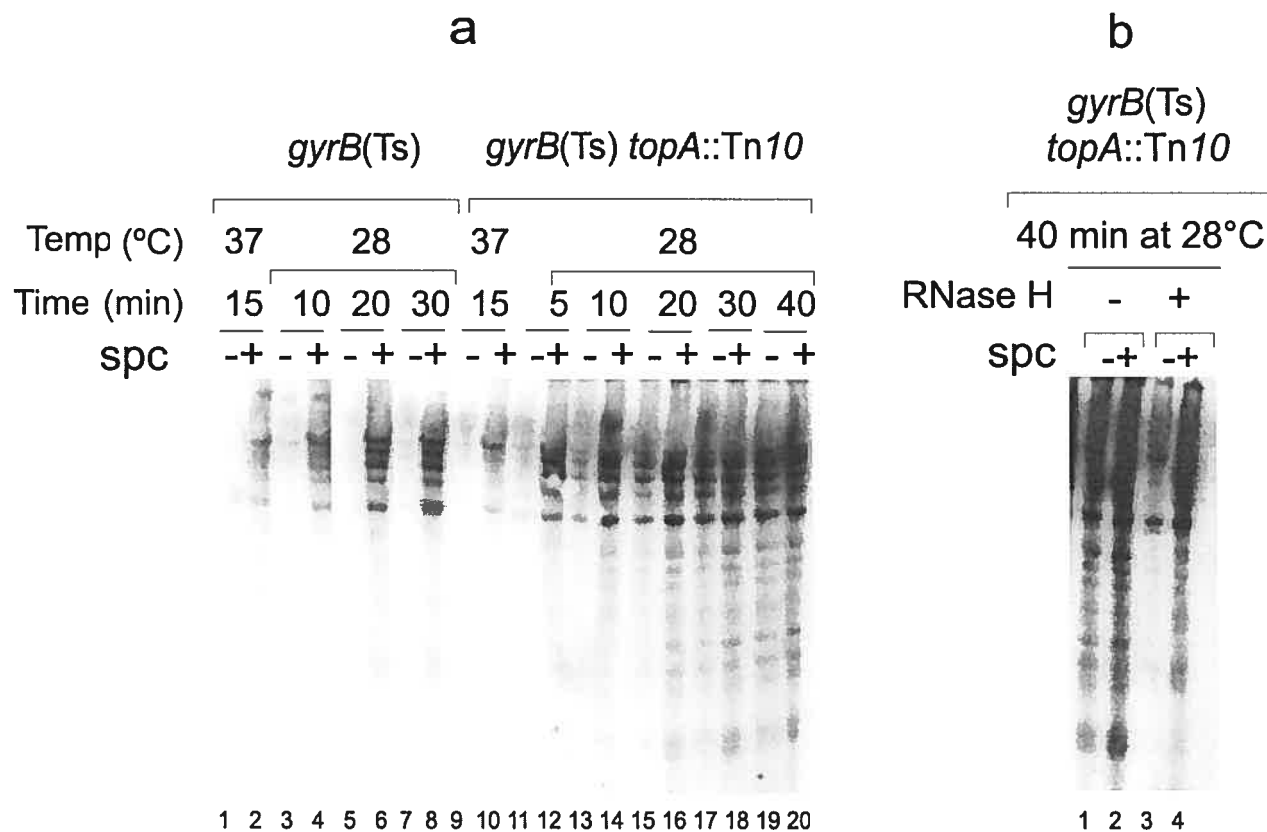
In our experimental scheme, spectinomycin at 400  $\mu\text{g/ml}$  is added or not to exponentially growing cells at 37<sup>0</sup>C, 15 minutes before transferring them to 28<sup>0</sup>C. RNA is extracted at various times before and after the downshift and analysed to detect *crp* (Fig. 10) and ORF1-*fis* (Fig. 11) mRNAs, following electrophoresis in denaturing polyacrylamide gels. At first glance, it is evident that the addition of spectinomycin causes the accumulation of *crp* mRNA initiated at P1 promoter, whether the strain is *topA*<sup>+</sup> or *topA* null (Fig. 10a). However, it is also evident that *topA*<sup>+</sup> cells accumulate proportionally more full-length *crp* mRNA, relative to shorter RNAs, than *topA* null cells. Overproduction of RNase HI partially corrects this problem in the *topA* null cells (Fig. 10b, for example compare lanes 10 and 12), suggesting that RNase HI has a direct effect on *crp* expression (see discussion). Interestingly, the bands that seemed to be specific to *topA* null cells and that were accumulating slowly (Fig. 7, parenthesis), are now rapidly appearing when protein synthesis is inhibited, whether the cells are *topA*<sup>+</sup> or *topA* null (Fig. 10, parenthesis). This result indicates that their accumulation is related to the inhibition of protein synthesis, which is less dramatic in the *topA* null cells in the absence of spectinomycin. The inhibition of protein synthesis can cause an accumulation of *crp* mRNA due to its stabilization, or initiation at P1 could conceivably be stimulated, since P1 activity is autoregulated by CRP (Aiba, 1883). Whatever the reasons for the accumulation of these shorter than full-length *crp* RNAs, RNase HI clearly favours the accumulation of longer RNAs in the *topA* null cells. Fig. 11 demonstrates a very similar situation for ORF1-*fis* mRNA, though its accumulation elicited by the addition of



spectinomycin seems to be more important than for *crp* mRNA. In addition to the stabilizing effect of spectinomycin on ORF1-*fis* mRNA, its synthesis is also probably greatly stimulated due to the expansion of the NTP pool (Walker and Osuna, 2002).



**Figure 10. Effects of the translation inhibitor spectinomycin on *crp* P1 mRNA accumulation in a *topA* null mutant following a temperature downshift to reactivate gyrase.** Cells were grown and RNA extracted and analyzed as described in Fig. 7 except that, when indicated, spectinomycin at 400  $\mu\text{g/ml}$  final was added to the cell cultures at 37°C, 15 min. before their transfer to 28°C.



**Figure 11. Effects of the translation inhibitor spectinomycin on ORF1-*fis* mRNA accumulation in a *topA* null mutant following a temperature downshift to reactivate gyrase.** Cells were grown and RNA extracted and analyzed as described in Fig. 6c except that, when indicated, spectinomycin at 400  $\mu$ g/ml final was added to the cell cultures at 37°C 15 min. before their transfer to 28°C, and that the probe was ORF1FIS.

## 6.4 Discussion

In this paper, we have characterized the immediate physiological response following reactivation of DNA gyrase in the absence of DNA topoisomerase I. As predicted from the initial genetic experiments, we found that cell growth is immediately inhibited upon gyrase reactivation. Indeed, this is consistent with the original observation that *topA* null mutants grow extremely slowly, with a constant selective pressure for compensatory mutations often found in *gyrA* or *gyrB*. (DiNardo *et al.*, 1982). However, what causes this severe growth inhibition has remained unknown since then. Is it directly related to an inhibition of gene expression or is this triggered by problems associated with replication or recombination? Although DNA replication is clearly inhibited at the level of initiation in our *topA* null mutant after the temperature downshift, it is likely a consequence of protein synthesis inhibition and, therefore, not the reason for growth arrest. In previous studies, we have presented evidence that R-loop formation could occur during *in vivo* (Massé *et al.*, 1997) and *in vitro* (Phoenix *et al.*, 1997) transcription of a portion of the *rrnB* operon in the absence of DNA topoisomerase I. Furthermore, it was shown that such R-loops could inhibit rRNA synthesis in *topA* null mutants (Hraiky *et al.*, 2000). However, a reduction in the rate of ribosome synthesis cannot explain the immediate growth arrest following gyrase reactivation. Indeed, there are no obvious reasons why ribosomes that were made at the permissive temperature would not be active following the temperature downshift. The fact that the level of  $\beta$ -galactosidase activity in the *topA* null mutant at the non-permissive temperature is proportional to the amount of *lac* mRNA supports this assumption, and rather suggests that the amount of mRNA is the limiting factor for protein synthesis in the *topA* null mutant (compare Fig.1a, *Plac* and b, *PlacUV5*). The very weak RelA-dependent induction of ppGpp synthesis, which relies on the presence of actively translating ribosomes, in the *topA* null mutant at the non-permissive temperature, is also readily explained by the lack of mRNAs. Our results of northern blot experiments confirm that the *topA* null cells have a reduced ability to accumulate full-length mRNAs, immediately following gyrase reactivation. The problem is related to R-loops, because RNase HI overproduction allows the accumulation of full-length mRNAs. Since RNase HI overproduction also alleviates the growth problem of *topA* null mutants, the failure to accumulate full-length mRNAs in the absence of DNA

topoisomerase I explains the growth inhibition. When the decay rate of various mRNAs was measured following the addition of rifampicin, we found that mRNAs were as stable or even more stable in the *topA* null mutants when RNase HI was not overproduced (not shown and see below). Therefore, the best explanation for the RNase HI effect on full-length mRNAs accumulation is a positive and direct effect on transcription elongation. The direct effect of RNase HI is supported by the results of our experiments where protein synthesis was inhibited before transferring the cells to the non-permissive temperature (Fig. 10 and 11). Under these conditions, RNase HI overproduction was found to be equally efficient in promoting the accumulation of full-length mRNAs. A direct effect of RNase HI on transcription is consistent with results demonstrating a stimulation of RNA synthesis by RNase HI during *in vitro* transcription of supercoiled templates (Massé *et al.*, 1997; Gopal *et al.*, 1999; Drolet *et al.*, 2003). It is also fully consistent with the fact that rRNA synthesis is stimulated by RNase HI overproduction in the absence of topoisomerase I (Hraiky *et al.*, 2000).

Interestingly, despite the well-documented effects of supercoiling on transcription initiation (Menzel and Gellert, 1994), the results presented in this paper indicate that it is not through this step that gene expression is impaired subsequently leading to growth inhibition of *topA* null mutants. Moreover, our primer extension experiments failed to reveal any significant differences among our strains at the level of transcription initiation that could be related to supercoiling, although global negative supercoiling is clearly higher in the *topA* null mutant at the non-permissive temperature. For example, even if *fis* expression is greater in the *topA* null mutant not overproducing RNase HI at 28°C and that the expression of this gene is known to be sensitive to supercoiling (Schneider *et al.*, 2000), our results indicate that this increase in *fis* expression is related to growth phase-dependent control (Walker and Osuna, 2002), not supercoiling. Indeed, even though negative supercoiling almost immediately increases following the transfer of *topA* null cells to the non-permissive temperature, *fis* mRNA reaches its higher level only 20 to 30 min. following this transfer (Fig. 8b). Moreover, a similar increase in negative supercoiling is also taking place following the transfer of the *topA* null cells overproducing RNase HI, to the non-permissive temperature. However, in this case, the growth problem is corrected and *fis* expression barely increases. Therefore, in our hands,

the growth phase-dependent control mediated by the NTP pool (Walker and Osuna, 2002), seems to largely out compete the supercoiling effects to regulate *fis* promoter activity. On the whole, our results also demonstrate the dramatic effects of supercoiling on transcription elongation as compared to the initiation step.

The procedure that was used to reactivate DNA gyrase, a temperature downshift from 37 to 28°C, also constitutes a stress, as shown by our results of  $\beta$ -galactosidase assays (Fig. 1). The fact that this temperature downshift is indeed a stressful condition for *topA* null cells was previously demonstrated, when hypernegative DNA supercoiling related to R-loop formation was shown to take place in strains devoid of compensatory temperature-sensitive mutations, upon transferring the cells from 37 to 28°C (Massé and Drolet 1999c). Moreover, our results of  $\beta$ -galactosidase assays in an *rnhA* null mutant also suggest that such a downshift promotes R-loop formation. It is tempting to speculate that a transient decrease in protein synthesis in wild-type cells, illustrated by a drop in  $\beta$ -galactosidase activity, follows the temperature downshift and triggers the formation of R-loops, which are rapidly removed owing to the presence of RNase HI. Thereafter, protein synthesis, exemplified by  $\beta$ -galactosidase activity, can resume at a normal rate. What could trigger R-loop formation? Ribosomes are known to be sensitive to temperature fluctuations (VanBogelen and Neidhardt, 1990). In this situation, uncoupling of translation and transcription could favour R-loop formation (see ref. Massé and Drolet, 1999c for the model). More experiments are definitively required to test this model. The involvement of DNA topoisomerase I in stress resistance in *Escherichia coli* is well established. Indeed, the *topA* gene is transcribed from several promoters, including one  $\sigma$ S- and one  $\sigma$ 32- controlled promoters (Rui and Tse-Dinh, 2003). Moreover, *topA* null mutants are known to be very sensitive to various stresses, including heat-shock and oxidative challenges (Qi *et al.*, 1996; Tse-Dinh, 2000). Interestingly, RNase HI overproduction was recently shown to restore stress resistance and to allow the expression of stress-induced genes in the absence of topoisomerase I (Cheng *et al.*, 2003). Furthermore, *rnhA* mutants share many of the phenotypes related to stress with *topA* null mutants (Drolet *et al.*, 2003; Fortin and Drolet manuscript in preparation). It is also worth mentioning that the procedure that was used to transfer a *topA* null allele into wild-type

cells by transduction, in the initial genetic experiments (DiNardo *et al.*, 1982), also constitutes a stress.

Our results indicate that after a while, the growth of the *topA* null cells eventually resumes following the temperature downshift (Fig. 1a), albeit at a lower rate, which is likely influenced by the ability of the cells to make ribosomes (Hraiky *et al.*, 2000). This transient growth inhibition might seem surprising as gyrase remains as active throughout the incubation at 28°C. An inhibition of protein synthesis is known to cause the stabilization of RNAs in the cell (Lopez *et al.*, 1998). This appears to be related to an overproduction of rRNAs, the synthesis of which is known to be stimulated by protein synthesis inhibition, which in turn causes a depletion of ribonucleases also involved in mRNA decay (Lopez *et al.*, 1998). We found that after a while, various mRNAs, such as *lac* and *tetA* from pBR322, are actually stabilized in *topA* null cells at 28°C (Broccoli *et al.* manuscript in preparation). Moreover, we have found that the accumulation of fragments of the rRNA leader in *topA* null mutants, can be reversed by overproducing the 3' to 5' exoribonuclease, PNPase (Hraiky *et al.*, unpublished results). We speculate that the chemical stabilization of mRNAs owing to the inhibition of protein synthesis that causes a shortage of ribonucleases, can eventually compensate for the low efficiency of full-length mRNA synthesis, and provide a steady-state level of mRNAs, that is now compatible with growth. However, in the case of  $\beta$ -galactosidase synthesis, the stabilization of *crp* and *lac* mRNAs is probably not sufficient to compensate for their low efficiency of synthesis.

In conclusion, our results demonstrate that the essential function of topoisomerase I is related to transcription elongation, to inhibit R-loop formation and to allow the synthesis of full-length mRNAs. Consistent with the involvement of DNA topoisomerase I in transcription, is the recent demonstration of an interaction between this enzyme and the  $\beta'$  subunit of RNA polymerase (Cheng *et al.*, 2003). Interestingly, the section of topoisomerase I responsible for this interaction with RNA polymerase, was shown to be required for stress resistance. It would also be worth testing the hypothesis that the apparent involvement of topoisomerase I in bacterial virulence (Dozois *et al.*, 2003), is related to its major function in transcription.

## 6.5 Materials and Methods

***E. coli* strains.** *Escherichia coli* strains used in this work are described in Table 1. AQ634 derivatives were used in all the experiments except when *lac* expression was measured from the *lacUV5* promoter. The L37UV5 mutation (*lacUV5* promoter) was transferred by conjugation from the Hfr strain CA88224.1 (Arditti *et al.*, 1968) to RFM445 and RFM480 as described in Miller (Miller, 1992). *Lac*<sup>+</sup> phenotype were selected as red colonies on lactose MacConkey Agar containing streptomycin (100 g/ml) for counter selection. To ensure that *topA::Tn10* in RFM480 was not replaced by a wild-type *topA* allele, tetracycline at 50 µg/ml was added. The resulting conjugates were called IB97 (from CA88224.1 X RFM445) and IB96 (from CA88224.1 X RFM480).

**Plasmids.** pSK760 and pSK762c are pBR322 derivatives which, respectively, carry the wild-type *rnhA* gene or a mutated and inactive version of this gene (Drolet *et al.*, 1995). pEM001 and pEM003 are pACYC184 derivatives which, respectively, carry the wild-type *rnhA* gene or a mutated and inactive version of this gene (Massé *et al.*, 1997).

**Media and growth conditions.** Unless otherwise indicated, cells were grown in VB Casa: Vogel-Bonner minimal medium (Drolet *et al.*, 1995) supplemented with casamino acids (0.1%), glucose (0.2%), required amino acids (0.5%), thiamine (5 µg/ml), thymine (10 µg/ml), cysteine (10 µg/ml). Bacteria from an overnight culture at 37°C were diluted 1/50 and grown as indicated. When needed, ampicillin was added at 50 µg/ml.

**β-Galactosidase assays.** β-galactosidase activity was assayed as described in Miller (Miller, 1992) with the following modifications: 2 ml of cells were disrupted with 100 µl of lysis buffer (2.5 ml β-Mercaptoethanol, 0.5 ml toluene, 0.5 ml MnSO<sub>4</sub> 0.02M, 0.5 ml SDS 10 %) for 10 min. at 28°C. Next, 75 µl of the disrupted cells were mixed with 725 µl of NaPO<sub>4</sub> buffer (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, pH 7.0) and 200 µl of ONPG (o-nitrophenyl β-D-galactopyranoside) at 4 mg/ml.



**Pulse-labeling of DNA.** Overnight cultures were diluted in fresh medium supplemented with thymidine at 8  $\mu\text{g/ml}$  and grown at 37°C to an OD<sub>600</sub> of 0.4. The cells were then transferred to 28°C and pulse-labeling was initiated by taking 300  $\mu\text{l}$  of the cells suspension and mixing them with [<sup>3</sup>H]-thymidine (4  $\mu\text{Ci}$  of a 20 Ci/mmol stock solution). Labeling was stopped by the addition of 2 volumes of ice-cold TCA 10% (trichloroacetic acid) and 100  $\mu\text{g/ml}$  of thymidine. The labeled material was then precipitated on glass microfiber filters (GF/B, Whatman) once with 10 ml of ice-cold TCA 10% and twice with 10 ml of ice-cold TCA 5%. The filters were then washed twice with 10 ml of ethanol 95% and dried at room temperature. Filters were transferred to vials containing 10 ml of scintillation cocktail (Cytoscint, ICN) and the incorporation of [<sup>3</sup>H]-thymidine was measured in a scintillation counter (Beckman LS 6000 SC).

**ppGpp measurement.** Strains were grown in MOPS medium (Neidhardt *et al.*, 1974) at low phosphate concentration (0.3 mM final) to exponential phase at 37°C. At an OD<sub>600</sub> of 0.2, 150  $\mu\text{Ci/ml}$  of [<sup>32</sup>P]-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Amersham Biosciences) were added and the cells were grown for one doubling at 37°C before being transferred to 28°C and incubated for 40 min. When specified, serine hydroxamate was added (1 mg/ml) to induce RelA-dependent ppGpp synthesis and the cells were incubated for an additional 10 min at 28°C. After the addition of one volume of 13 M formic acid, the cells were lysed by three successive freeze-thaw cycles. Samples were centrifuged (13000 rpm for 5 min) and an aliquot of the supernatant was spotted on a polyethyleneimine-cellulose plate (Machery-Nagel) for the separation of the phosphorylated guanosine nucleotides by thin-layer chromatography in 1.5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

**RNA extraction.** RNA extraction was performed by using the TRIZOL reagent (Invitrogen) as described (Wassarman and Storz, 2000). RNA extracted with a modified hot-phenol method (Hraiky *et al.*, 2000) produced identical results.

**Primer Extension.** 10  $\mu\text{g}$  of RNA were used for primer extension as described (Hraiky *et al.*, 2000). The CAP3 primer (Gonzalez-Gil *et al.*, 1998) was used to detect RNA

transcripts initiated at P1 and P2 *crp* promoters, whereas the *lac* primer with the following sequence, d(CGACGTTGTAAAACGACGGCC), was used to detect RNA transcripts initiated at either the wild-type *lac* promoter or the mutated *lacUV5* one.

**Northern blots.** Northern blots of RNA samples separated by electrophoresis in 1.2 % agarose gels containing formaldehyde were performed as described (Hraiky *et al.*, 2000). Northern blots of RNA samples separated by electrophoresis in 6 % polyacrylamide denaturing gels were done as described (Jerome *et al.*, 1999). LACZ oligonucleotide, d(TGAATCCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCAC), was used to detect *lac* mRNAs, CRP1 d(GCACCCCTAATGTGACGTCCTTTGCATACATGCAGTACATCAATGTATTACTGTAG) and CRP2 d(GGCAATGAGACAAGAACCATTTCGAGAGTCGGGTCTGTTTGCGGTTTGCCAA GCACC) oligonucleotides to detect *crp* mRNAs respectively initiated at P1 and both P1 and P2 promoters, and ORF1FIS, d(CCGGCTCCCATCTCGTAGCACAACGTCCGAAAAGGTCTGTCTGTAATGCCA GCC) and FIS 3' oligonucleotides d(GCGTACCACGGTTGATGCCCATCATCAGCGCAGCACGGGTCTGGTTACCAC GGG) to detect *fis* mRNAs respectively at the 5' and 3' ends.

## **6.6 Acknowledgements**

We thank Sonia Broccoli for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants FNR 12667 from the CIHR (to M.D.) and GM54226 from NIGMS (to Y.-C.T.-D.). M.D. is a chercheur-boursier senior from the FRSQ. C.H. holds a studentship award from the FRSQ.

## 6.7 References

- Aiba, H. (1983) Autoregulation of the *Escherichia coli crp* gene: CRP is a transcriptional repressor for its own gene. *Cell*, **32**, 141-149.
- Arditti, R.R., Scaife, J.G. and Beckwith, J.R. (1968) The nature of mutants in the lac promoter region. *J Mol Biol*, **38**, 421-426.
- Ball, C.A., Osuna, R., Ferguson, K.C. and Johnson, R.C. (1992) Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **174**, 8043-8056.
- Champoux, J.J. (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem*, **70**, 369-413.
- Chatterji, D. and Ojha, A.K. (2001) Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Curr Opin Microbiol*, **4**, 160-165.
- Cheng, B., Rui, S., Ji, C., Gong, V.W., Van Dyk, T.K., Drolet, M. and Tse-Dinh, Y.C. (2003) RNase H overproduction allows the expression of stress-induced genes in the absence of topoisomerase I. *FEMS Microbiol Lett*, **221**, 237-242.
- Cheng, B., Zhu, C.X., Ji, C., Ahumada, A. and Tse-Dinh, Y.C. (2003) Direct interaction between *E. coli* RNA polymerase and the zinc ribbon domains of DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*. Jun 4 [Epub ahead of print]
- DiNardo, S., Voelkel, K.A., Sternglanz, R., Reynolds, A.E. and Wright, A. (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell*, **31**, 43-51.
- Dozois, C.M., Daigle, F. and Curtiss, R., 3rd. (2003) Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 247-252.

- Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., Massé, E., Liu, L.F. and Crouch, R.J. (1995) Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* delta *topA* mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 3526-3530.
- Drolet, M., Broccoli, S., Rallu, F., Hraiky, C., Fortin, C., Massé, E. and Baaklini, I. (2003) The problem of hypernegative supercoiling and R-loop formation in transcription. *Front Biosci*, **8**, D210-221.
- Gonzalez-Gil, G., Kahmann, R. and Muskhelishvili, G. (1998) Regulation of *crp* transcription by oscillation between distinct nucleoprotein complexes. *EMBO J*, **17**, 2877-2885.
- Gopal, V., Brieba, L.G., Guajardo, R., McAllister, W.T. and Sousa, R. (1999) Characterization of structural features important for T7 RNAP elongation complex stability reveals competing complex conformations and a role for the non-template strand in RNA displacement. *J Mol Biol*, **290**, 411-431.
- Hraiky, C., Raymond, M.A. and Drolet, M. (2000) RNase H overproduction corrects a defect at the level of transcription elongation during rRNA synthesis in the absence of DNA topoisomerase I in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **275**, 11257-11263.
- Jerome, L.J., van Biesen, T. and Frost, L.S. (1999) Degradation of FinP antisense RNA from F-like plasmids: the RNA-binding protein, FinO, protects FinP from ribonuclease E. *J Mol Biol*, **285**, 1457-1473.
- Liu, L.F. and Wang, J.C. (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7024-7027.
- Lopez, P.J., Marchand, I., Yarchuk, O. and Dreyfus, M. (1998) Translation inhibitors stabilize *Escherichia coli* mRNAs independently of ribosome protection. *Proc Natl Acad*

*Sci U S A*, **95**, 6067-6072.

Massé, E., Phoenix, P. and Drolet, M. (1997) DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the *rrnB* operon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **272**, 12816-12823.

Massé, E. and Drolet, M. (1999a) Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, **274**, 16654-16658.

Massé, E. and Drolet, M. (1999b) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J Biol Chem*, **274**, 16659-16664.

Massé, E. and Drolet, M. (1999c) R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *Escherichia coli topA* mutants preferentially occurs at low temperatures and correlates with growth inhibition. *J Mol Biol*, **294**, 321-332.

Menzel, R. and Gellert, M. (1994) The biochemistry and biology of DNA gyrase. *Adv Pharmacol*, **29A**, 39-69.

Miller, J. H. (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Nasser, W., Schneider, R., Travers, A. and Muskhelishvili, G. (2001) CRP modulates *fis* transcription by alternate formation of activating and repressing nucleoprotein complexes. *J Biol Chem*, **276**, 17878-17886.

Neidhardt, F.C., Bloch, P.L. and Smith, D.F. (1974) Culture medium for enterobacteria. *J Bacteriol*, **119**, 736-747.

- Nicholson, A.W. (1999) Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol Rev*, **23**, 371-390.
- Ninnemann, O., Koch, C. and Kahmann, R. (1992) The *E.coli fis* promoter is subject to stringent control and autoregulation. *EMBO J*, **11**, 1075-1083.
- Ogawa, T., Pickett, G.G., Kogoma, T. and Kornberg, A. (1984) RNase H confers specificity in the *dnaA*-dependent initiation of replication at the unique origin of the *Escherichia coli* chromosome in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 1040-1044.
- Phoenix, P., Raymond, M.A., Massé, E. and Drolet, M. (1997) Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation *in vitro*. *J Biol Chem*, **272**, 1473-1479.
- Pruss, G.J., Manes, S.H. and Drlica, K. (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell*, **31**, 35-42.
- Qi, H., Menzel, R. and Tse-Dinh, Y.C. (1996) Effect of the deletion of the sigma 32-dependent promoter (P1) of the *Escherichia coli* topoisomerase I gene on thermotolerance. *Mol Microbiol*, **21**, 703-711.
- Rui, S. and Tse-Dinh, Y.C. (2003) Topoisomerase function during bacterial responses to environmental challenge. *Front Biosci*, **8**, D256-263.
- Schneider, R., Travers, A. and Muskhelishvili, G. (2000) The expression of the *Escherichia coli fis* gene is strongly dependent on the superhelical density of DNA. *Mol Microbiol*, **38**, 167-175.

- Sorensen, M.A., Jensen, K.F. and Pedersen, S. (1994) High concentrations of ppGpp decrease the RNA chain growth rate. Implications for protein synthesis and translational fidelity during amino acid starvation in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **236**, 441-454.
- Sorensen, M.A. (2001) Charging levels of four tRNA species in *Escherichia coli* Rel(+) and Rel(-) strains during amino acid starvation: a simple model for the effect of ppGpp on translational accuracy. *J Mol Biol*, **307**, 785-798.
- Steck, T.R. and Drlica, K. (1984) Bacterial chromosome segregation: evidence for DNA gyrase involvement in decatenation. *Cell*, **36**, 1081-1088.
- Svitil, A.L., Cashel, M. and Zyskind, J.W. (1993) Guanosine tetraphosphate inhibits protein synthesis *in vivo*. A possible protective mechanism for starvation stress in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **268**, 2307-2311.
- Tse-Dinh, Y.C. (1998) Bacterial and archeal type I topoisomerases. *Biochim Biophys Acta*, **1400**, 19-27.
- Tse-Dinh, Y.C. (2000) Increased sensitivity to oxidative challenges associated with *topA* deletion in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **182**, 829-832.
- VanBogelen, R.A. and Neidhardt, F.C. (1990) Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 5589-5593.
- Walker, K.A. and Osuna, R. (2002) Factors affecting start site selection at the *Escherichia coli* *fis* promoter. *J Bacteriol*, **184**, 4783-4791.
- Wang, J.C. (1996) DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem*, **65**, 635-692.



Wassarman, K.M. and Storz, G. (2000) 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. *Cell*, **101**, 613-623.

## 7 DISCUSSION

Dans ce travail, nous avons étudié les effets de l'absence de la topoisomérase I sur la physiologie des cellules. Les souches *topA<sup>-</sup>* qui ont servi dans cette étude, possèdent une mutation compensatoire thermosensible dans le gène *gyrB*. Cette mutation diminue considérablement l'activité de la gyrase et s'exprime à 37°C et plus. Elle permet au mutant *topA* de pouvoir pousser normalement à 37°C (DiNardo et al., 1982). Cependant, à 28°C, et à des températures plus basses, la gyrase redevient pleinement active et les cellules se comportent alors comme de vrais mutants *topA*. C'est dans ce contexte de réactivation de la gyrase, suite à un changement de température de 37 à 28°C, que les effets de la perte de topoisomérase I sur la physiologie des cellules ont été étudiés. Suite à la réactivation de la gyrase, nous observons que la croissance du mutant *topA<sup>-</sup>* cesse immédiatement. La croissance peut éventuellement reprendre plus tard à un taux cependant très faible. L'inhibition de l'initiation de la réplication corrèle avec cette arrêt de la croissance, et suggère que la réactivation de la gyrase aboutit à l'inhibition de la synthèse protéique. De même, l'absence de stimulation de la réponse stringente *relA*-dépendante suggère également que l'arrêt de la synthèse protéique du mutant *topA<sup>-</sup>* est principalement causée par une diminution importante du nombre d'ARNm. En effet, les expériences d'extension d'amorce et de northern blot, indiquent que les niveaux d'initiation aux promoteurs *crp* et *lacUV5* sont identiques dans toutes les souches, et que les mutants *topA* synthétisent proportionnellement plus d'ARNs courts que d'ARNs longs. D'autre part, il n'y a aucune raison de croire que les ribosomes synthétisés à 37°C sont inactifs à 28°C ce qui expliquerait une baisse de la synthèse protéique, d'autant plus que l'augmentation de la quantité d'ARN *lacZ* pleine longueur dans une souche *lacUV5* par rapport à une souche *lacZ*, corrèle avec celle de l'augmentation de la  $\beta$ -galactosidase. Cette dernière observation montre aussi que la machine de traduction est toujours fonctionnelle dans le mutant *topA* à 28°C.

Cette difficulté qu'a le mutant *topA* à synthétiser des ARNs pleine longueur, est donc due à une inhibition de l'élongation transcriptionnelle, comme le suggère en plus l'effet positif de la surproduction de la RNase H sur la formation d'ARNs pleine

longueur. Puisque la RNase H favorise également la croissance, l'arrêt de la croissance peut s'expliquer par la formation de R-loops ( Figure 1a; et Drolet et *al.*, 1995) qui inhibe l'élongation de la transcription, ce qui se traduit par la synthèse d'ARNs incomplets et une baisse de synthèse protéique. Supportée par l'inhibition de la croissance et la présence de courts ARNs dans un mutant *rnhA* (cependant en proportion moindre que dans un mutant *topA*), cette hypothèse n'est valable que si la surproduction de la RNase H a un effet direct sur la synthèse des ARNs messagers. En effet, la présence d'ARNs courts pourrait être attribuée à un processus d'endoclivage. Deux arguments en faveur de l'effet des nucléases sur la taille des ARNs dans le mutant *topA*, peuvent être relevés. Premièrement, un profil d'ARNs courts similaire entre les souches témoins et le mutant *topA*, avec cependant une intensité plus forte pour le mutant *topA*, peut suggérer que ces bandes représentent des produits de dégradation. Deuxièmement, l'accumulation à partir de 20 min à température restrictive des ces ARNs, suggère une pénurie de ribonucléases. Dans une étude récente, il a été montré que l'inhibition de la synthèse protéique stabilise les ARNs indépendamment de la protection par les ribosomes ( Lopez et *al.*, 1998). Dans cette étude, la stabilisation de l'ARN est causée par une pénurie de RNase E, car la surproduction de cette dernière élimine les ARNs accumulés. Dans un mutant *topA*, la surinitiation des ARN ribosomiaux suite à l'inhibition de leur synthèse par la formation de R-loops (Hraiky et *al.*, 2000), pourrait titrer les nucléases et créer une pénurie de ces dernières au niveau des ARNs.

En accord avec nos observations sur les ARNs, l'incorporation d'uridine tritiée montre que la synthèse d'ARN ribosomiaux (ARNr) 16S et 23S dans une souche *topA*<sup>-</sup> est diminuée (Hraiky et al 2000). Cette diminution de la quantité d'ARNs 16S et 23S, est indépendante de l'initiation car les souches *topA*<sup>-</sup> ont plutôt tendance à surinitier la synthèse de ces ARNs. L'accumulation d'ARNs courts dans la régions 16S, montre qu'il y a une inhibition de l'élongation de la transcription et explique pourquoi il y a moins d'ARN pleine longueur 16S et 23S et pourquoi le ratio 23S/16S est inférieur à 1. Si l'on considère que la transcription des opérons ribosomiaux représente 85% des événements transcriptionnel de la cellule, la plupart des nucléases pourraient se regrouper au niveau de ces ARNs, surtout dans le cas des mutants *topA*, dans lesquels ces opérons sont surexprimés. Cependant, dans un mutant *topA*, une redistribution plus subtile des

nucléases par rapport à l'abondance de leur substrat doit s'opérer. En effet, contrairement à une souche de type sauvage (WT) où la surinitiation des ARNs créerait une pénurie générale de nucléases, l'accumulation d'ARNs plus court dans la région 16S dans un mutant *topA* fournirait plus de substrat pour les exonucléases PNPase et RNase II, alors qu'une diminution de la quantité d'ARN 23S et 5S, priverait l'endonucléase RNase E de son substrat favori, le 9S, pour donner le 5S. Dans ce cas, une pénurie d'exonucléases et un excès d'endonucléases au niveau des ARNms, favoriserait l'accumulation d'ARNs courts, d'une part, suite à l'endoclivage des ARNms libres par la RNase E en excès et d'autre part, par le manque d'exonucléases. Cependant, cette hypothèse est peu probable car dans le mutant *topA* on note plutôt l'accumulation de certains ARNs tels que *crp* initiés à P1, qu'ils soient longs ou courts, même si, dans l'ensemble, les courts sont proportionnellement plus nombreux.

L'inhibition de la synthèse protéique par des drogues comme la spectinomycine, est connue pour ses effets positifs sur l'initiation de la synthèse des ARNs, et sur la stabilisation des ARNms (Lopez et al., 1998). Le traitement à la spectinomycine à 37°C, révèle une stabilisation identique de longs ARNs chez toutes les souches utilisées dans notre étude. Immédiatement après le transfert à température restrictive, on observe l'apparition en forte intensité de courts ARNs dans la souche *topA*<sup>-</sup>, alors que même après 40 minutes, et ceci indépendamment des souches, l'intensité des ARNs longs reste constante en quantité et qualité. Dans ce cas, la subtile redistribution de la RNase E vers les ARNms ne peut expliquer à elle seule la présence de courts ARNs dans un mutant *topA*, car le ratio de longs par rapport au courts n'est pas en faveur des courts. De plus, certaines espèces d'ARN qui apparaissent dans le mutant *topA* avec une sonde 5', ne trouvent pas leur équivalent avec l'utilisation d'une sonde 3'. Ceci montre que ces petits ARNs ne sont pas issus d'un endoclivage de plus longs ARNs. Par contre, ce qui semble être plus évident, c'est la stabilisation des ARNs synthétisés dans les différentes souches. En effet, des expériences avec la rifampicine confirment que les ARNs dans le mutant *topA* sont autant, sinon plus stable que ceux des souches isogéniques (résultats non-montrés). Cette dernière donnée pourrait expliquer pourquoi dans un mutant *topA*, il y a accumulation avec le temps des ARNs produits, qu'ils soient courts ou longs. La

présence d'ARNs courts pourrait aussi représenter des produits de terminaison prématurée de la transcription, causée par la formation de R-loops. En effet, stimulée par une inhibition de la synthèse protéique, l'accumulation de ces ARNs courts dans un mutant *topA* est beaucoup plus lente quand la RNase H est surproduite. Cette accumulation avec le temps pourrait tout simplement s'expliquer par une pénurie graduelle de la RNase H au niveau des ARNs, comme c'est le cas pour les autres ribonucléases. Le fait que la RNase H a toujours un effet sur la quantité de ces ARNs courts dans le mutant *topA*, malgré la présence de spectinomycine depuis 15 minutes avant le transfert à 28°C, supporte un effet direct de la RNase H sur la transcription. Des expériences *in vitro*, nous permettraient de confirmer cet effet direct de la RNase H sur la transcription.

La formation d'hybrides ARN-ADN en présence d'un inhibiteur de synthèse protéique, serait favorisée par un découplage entre la traduction et la transcription, qui rendrait alors les ARNs nus et de ce fait plus susceptibles de s'hybrider avec le brin matrice d'ADN. Ceci pourrait expliquer en partie l'apparition en présence de spectinomycine, d'une plus forte quantité d'ARNs courts dans les souches *topA*<sup>+</sup> et *topA*<sup>-</sup>. La chute brutale et instantanée de la  $\beta$ -galactosidase dans toutes les souches directement après le passage à 28°C, pourrait s'expliquer par une inactivation transitoire des ribosomes. Cette inactivation entraînerait un découplage transitoire de la traduction-transcription, qui déclencherait la formation de R-loops, facilitée dans une souche *topA*- par l'état de surenroulement négatif de l'ADN suite à la réactivation de la gyrase. En effet, la quantité de  $\beta$ -galactosidase chute instantanément après le passage à 28°C dans une souche *topA*<sup>-</sup> qui surproduit la RNase H, et remonte très vite par la suite. Les souches *gyrB*(Ts), WT et *rnhA*, semblent expérimenter le même phénomène de découplage après le passage de 37 à 28°C, sauf que la présence de la topoisomérase I prévient la formation de R-loops en relaxant le surenroulement négatif généré par la transcription. La présence de la topoisomérase I dans *rnhA*, limite jusqu'à une certaine mesure la formation de R-loops, puisque les valeurs de  $\beta$ -galactosidase dans cette souche, demeurent plus faibles que ceux de la souche WT. Ceci suggère que la formation de R-loops survient également dans les souches WT, à des degrés cependant moins importants que dans une souche *topA*, car

la quantité de RNase H dans ces cellules suffit pour les éliminer rapidement. L'augmentation du surenroulement négatif due à l'absence de topoisomérase I aurait donc pour effet d'amplifier la formation de R-loops, ce qui va de paire avec la nécessité de surproduire la RNase H dans un mutant *topA*.

La formation de R-loops aurait pour conséquence de déstabiliser le complexe d'élongation de la transcription, et de décrocher l'ARN synthétisé. Deux évidences dans nos résultats supportent cette hypothèse. Premièrement, le profil d'ARN est similaire chez toutes les souches, qu'elles soient *topA<sup>-</sup>* ou *topA<sup>+</sup>*. À cause de la technique d'extraction, un hybride ARN-ADN persistant serait détaché et l'on pourrait alors révéler la présence d'ARNs spécifiques au mutant *topA*, qui indiquerait la présence de R-loops. Comme ce n'est pas le cas soit que ces ARNs sont le résultat de clivages par des ribonucléases ou soit qu'ils sont des produits de terminaison à des séquences bien définies. Dans les deux cas, l'ARN doit être libre dans la cellule, comme le montre d'ailleurs les effets positifs de la surproduction de la PNPase sur de courts ARNs dans un mutant *topA* (Hraiky et Drolet, résultats non publiés). De ce fait, l'hypothèse de polymérase ARN arrêtées, par exemple au niveau de ces sites de terminaison particuliers suite à la formation de R-loops, est infirmée, d'autant plus que des expériences de footprints réalisés dans notre laboratoire ne révèlent pas de polymérase bloquée sur l'ADN (Hraiky et Drolet résultats non publiés). Deuxièmement, démontré par la stabilisation et l'accumulation d'ARNs courts, l'effet des ribonucléases sur les ARNs synthétisés suggère que l'hybride ARN-ADN n'est pas très long, laissant une partie de l'ARN accessible aux nucléases, mais surtout que les ARNs sont libres dans la cellule. Les résultats présentés dans ce travail sont insuffisants pour proposer un modèle de formation de R-loops, mais suggèrent plutôt que les R-loops ne sont pas longs, et ont pour conséquence d'inhiber la transcription et de libérer l'ARN synthétisé. En effet, la formation d'hybrides ARN-ADN lors de la transcription par la polymérase II à ColE1, sensibles à la RNase H (une origine de répllication connue pour former de long hybride ARN-ADN), cause la terminaison de la transcription à la suite d'une série de desoxyadénine (Tomizawa et Masukata, 1987). De même, la formation d'un hybride ARN-ADN sensible à la RNase H, déstabilise le complexe d'élongation de T7 (Gopal et

*al.*, 1999), et l'extension de l'hybride ARN-ADN au delà de 8 nucléotides dans la bulle de transcription diminue la processivité de l'ARN polymérase II (Kireeva et *al.*, 2000b)

En accord avec une étude antérieure (Massé et Drolet, 1999c), nos résultats confirment la formation de R-loops en absence de topoisomérase I à basse température, et corrèle avec l'inhibition de la croissance. Comme le montre aussi nos résultats, le rôle de la topoisomérase I est de prévenir la formation de R-loops en relaxant l'ADN surenroulé négativement dû à la transcription selon le « twin-domain model » ( Phoenix et *al.*, 1997, Masse et *al.*, 1999b). L'interaction de la topoisomérase I avec le domaine C-Terminal de l'ARN polymérase, va également dans le sens de son implication dans l'élongation de la transcription (Cheng et *al.*, 2003).

La topoisomérase I est importante pendant la transcription, car en son absence, la formation de R-loops inhibe la transcription pendant l'étape d'élongation, ce qui a pour conséquence de diminuer le nombre d'ARNs complets, et donc de limiter la synthèse protéique. Pour la première fois, nos résultats expliquent pourquoi les mutants *topA* sont bactériostatiques (DiNardo et *al.*, 1982) et sensible à divers stress (Rui et Tse-Dinh, 2003). En effet, la croissance et la survie d'une cellule à un stress, dépend de la synthèse de protéines, dont la première étape est la transcription. La sensibilité aux stress d'un mutant *topA* (Rui et tse-Dinh, 2003), est également démontrée dans ce travail par, (1) la chute brutale de synthèse de  $\beta$ -galactosidase vers une valeur quasi nulle suite au changement de température, qui remonte ensuite, à un taux cependant très faible, et (2), par le fait que les souches témoins subissent également une chute de synthèse de  $\beta$ -galactosidase après le transfert de 37 à 28°C. Cependant les conséquences de ce stress lors de la chute de température, est beaucoup plus important pour le mutant *topA* à cause de la réactivation de la gyrase qui entraîne la formation importante de R-loops. La formation de R-loops durant certains stress, laisse envisager un lien direct entre leur présence et le stress que subit les cellules. En effet, une étude récente (Cheng et *al.*, 2003) montre que la surproduction de la RNase H rend les mutants *topA*<sup>-</sup> plus résistants aux stress.

Nos résultats démontrent que les effets majeurs du surenroulement sur la transcription, se retrouve pendant l'étape d'élongation et sont liés à la formation de R-loops, comme l'effet de la surproduction de la RNase H. Le rôle de la RNase H *in vivo* est cependant peu connu. Dans notre étude nous avons utilisé la souche *rnha* comme élément de comparaison avec une souche *topA*. Parce que la surproduction de la RNase H corrige des défauts d'élongation dans le mutant *topA* et stimule la production d'ARN et que dans la souche *rnha* des problèmes semblables sont retrouvés, la RNase H apparaît comme un facteur de transcription. En régulant *in vivo* la longueur de l'hybride ARN-ADN, la RNase H aurait pour rôle de stimuler la transcription et favoriser la formation d'ARNs complets (Drolet et *al.*, 2003). Des expériences supplémentaires permettraient de localiser la RNase H dans la cellule, et serviraient à mieux comprendre son rôle durant la transcription.

Nos résultats suggèrent également de nouveaux intérêts de recherche. Le rôle de l'hybride ARN-ADN pendant la transcription et les effets des R-loops sur la terminaison sont peu connus. Les travaux effectués dans ce sens ont été cités en introduction. Brièvement, la longueur de l'hybride ARN-ADN dans la bulle de transcription, ainsi que l'interaction de la polymérase ARN avec des structures en dehors de la bulle de transcription, comme par exemple un hybride ARN-ADN, pourraient avoir un effet sur la stabilité du complexe d'élongation. Le mutant *topA<sup>-</sup>* fournirait, dans ce cas, un modèle d'étude idéal pour mieux comprendre la formation et le rôle des hybrides ARN-ADN pendant la transcription. Soulignons qu'au préalable des expériences sont cependant nécessaires pour identifier les séquences favorables à la formation de R-loops, et pour catégoriser la nature des ces R-loops. L'étude de la topoisomérase I comme facteur d'antiterminaison est présentement à l'étude. D'autre part, la recherche de preuves convaincantes de la formation de R-loops dans les souches sauvages, ainsi que l'étude de leurs conséquences sur les fonctions de l'ADN, aideraient à généraliser le phénomène des R-loops et à déterminer leur importance dans la physiologie des cellules.

Pour compléter ce travail, il serait utile d'étudier plus en détail la nature ainsi que l'origine des courts ARNs dans le mutant *topA*. Pour tester l'hypothèse qu'ils sont causés



par une terminaison prématurée de la transcription, la comparaison du profil des ARN synthétisés *in vitro* par rapport à *in vivo*, nous indiquerait lesquelles sont issus d'une terminaison prématurée. Pour séparer les ARNs produits par un clivage du reste des ARNs, une variante avec ou sans ribonucléases pourrait être ajoutée *in vitro*. Pour tester l'effet des nucléases sur les ARNs dans le mutant *topA*, un effet positif de la surproduction d'exonucléases et ou, d'endonucléases dans cette souche, nous indiquerait la présence d'une pénurie de nucléases et nous renseignerait également sur la redistribution des ces dernières. Plus utile encore, des mutants *topA<sup>-</sup>rne<sup>-</sup>*, difficiles à construire parce que d'une part, l'absence de RNase E rend les cellules très malades et, d'autre part, parce que les seules mutations utilisables de la RNase E sont thermosensibles, nous permettrait de trancher sur le rôle de la RNase E dans la formation d'ARNs court dans le mutant *topA*. Grâce à ces expériences, un nouveau mécanisme de régulation des ribonucléases dans la cellule pourrait être mis à jour. Enfin, l'effet du découplage traduction-transcription sur la formation de R-loops, ainsi que les conséquences sur la transcription de ce découplage, pourraient être étudié à l'aide de gènes dont la région Shine-Dalgarno a été mutée.

## 8 BIBLIOGRAPHIE

Aguilera, A. (2002) The connection between transcription and genomic instability. *EMBO J*, **21**, 195-201.

Aguilera, A., Chavez, S. and Malagon, F. (2000) Mitotic recombination in yeast: elements controlling its incidence. *Yeast*, **16**, 731-754.

Albert, A.C., Spirito, F., Figueroa-Bossi, N., Bossi, L. and Rahmouni, A.R. (1996) Hyper-negative template DNA supercoiling during transcription of the tetracycline resistance gene in topA mutants is largely constrained in vivo. *Nucleic Acids Res*, **24**, 3093-3099.

Arditti, R.R., Scaife, J.G. and Beckwith, J.R. (1968) The nature of mutants in the lac promoter region. *J Mol Biol*, **38**, 421-426.

Artsimovitch, I. and Landick, R. (1998) Interaction of a nascent RNA structure with RNA polymerase is required for hairpin-dependent transcriptional pausing but not for transcript release. *Genes Dev*, **12**, 3110-3122.

Artsimovitch, I. and Landick, R. (2000) Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7090-7095.

Asai, T. and Kogoma, T. (1994) D-loops and R-loops: alternative mechanisms for the initiation of chromosome replication in Escherichia coli. *J Bacteriol*, **176**, 1807-1812.

Asai, T. and Kogoma, T. (1994) The RecF pathway of homologous recombination can mediate the initiation of DNA damage-inducible replication of the Escherichia coli chromosome. *J Bacteriol*, **176**, 7113-7114.

Baker, T.A. and Kornberg, A. (1988) Transcriptional activation of initiation of replication from the E. coli chromosomal origin: an RNA-DNA hybrid near oriC. *Cell*, **55**, 113-123.

Beletskii, A. and Bhagwat, A.S. (1996) Transcription-induced mutations: increase in C to T mutations in the nontranscribed strand during transcription in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13919-13924.

Borukhov, S., Polyakov, A., Nikiforov, V. and Goldfarb, A. (1992) GreA protein: a transcription elongation factor from Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 8899-8902.

Borukhov, S., Sagitov, V. and Goldfarb, A. (1993) Transcript cleavage factors from E. coli. *Cell*, **72**, 459-466.

Brill, S.J. and Sternglanz, R. (1988) Transcription-dependent DNA supercoiling in yeast DNA topoisomerase mutants. *Cell*, **54**, 403-411.

Broccoli, S., Phoenix, P. and Drolet, M. (2000) Isolation of the topB gene encoding DNA topoisomerase III as a multicopy suppressor of topA null mutations in Escherichia coli. *Mol Microbiol*, **35**, 58-68.

Brock, R.D. (1971) Differential mutation of the beta-galactosidase gene of Escherichia coli. *Mutat Res*, **11**, 181-186.

Carpousis, A.J. and Gralla, J.D. (1980) Cycling of ribonucleic acid polymerase to produce oligonucleotides during initiation in vitro at the lac UV5 promoter. *Biochemistry*, **19**, 3245-3253.

Chamberlin, M.J. (Datta and Jinks-Robertson, 1995). New Models for the mechanism of transcription elongation and its regulation, p.1-21. *The Harvey lectures*. Wiley-Liss, New York, N.Y.

- Champoux, J.J. (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem*, **70**, 369-413.
- Charbonnier, F. and Forterre, P. (1994) Comparison of plasmid DNA topology among mesophilic and thermophilic eubacteria and archaeobacteria. *J Bacteriol*, **176**, 1251-1259.
- Cheng, B., Rui, S., Ji, C., Gong, V.W., Van Dyk, T.K., Drolet, M. and Tse-Dinh, Y.C. (2003a) RNase H overproduction allows the expression of stress-induced genes in the absence of topoisomerase I. *FEMS Microbiol Lett*, **221**, 237-242.
- Cheng, B., Zhu, C.X., Ji, C., Ahumada, A. and Tse-Dinh, Y.C. (2003b) Direct interaction between E. coli RNA polymerase and the zinc ribbon domains of DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*.
- Coburn, G.A. and Mackie, G.A. (1999) Degradation of mRNA in Escherichia coli: an old problem with some new twists. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **62**, 55-108.
- Cook, D.N., Ma, D., Pon, N.G. and Hearst, J.E. (1992) Dynamics of DNA supercoiling by transcription in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10603-10607.
- Cozarelli, N.R., Christian Boles T., and White J.H (1990). Primer on the Topology and geometry of DNA Supercoiling. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 139-184.
- Datta, A. and Jinks-Robertson, S. (1995) Association of increased spontaneous mutation rates with high levels of transcription in yeast. *Science*, **268**, 1616-1619.
- Daube, S.S. and von Hippel, P.H. (1994) RNA displacement pathways during transcription from synthetic RNA-DNA bubble duplexes. *Biochemistry*, **33**, 340-347.

- DiGate, R.J. and Marians, K.J. (1988) Identification of a potent decatenating enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **263**, 13366-13373
- DiGate, R.J. and Marians, K.J. (1989) Molecular cloning and DNA sequence analysis of *Escherichia coli* topB, the gene encoding topoisomerase III. *J Biol Chem*, **264**, 17924-17930.
- DiGate, R.J. and Marians, K.J. (1992) *Escherichia coli* topoisomerase III-catalyzed cleavage of RNA. *J Biol Chem*, **267**, 20532-20535.
- DiNardo, S., Voelkel, K.A., Sternglanz, R., Reynolds, A.E. and Wright, A. (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell*, **31**, 43-51.
- Drlica, K. (1992) Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol Microbiol*, **6**, 425-433.
- Drlica, K. and Snyder, M. (1978) Superhelical *Escherichia coli* DNA: relaxation by coumermycin. *J Mol Biol*, **120**, 145-154.
- Drolet, M., Broccoli, S., Rallu, F., Hraiky, C., Fortin, C., Masse, E. and Baaklini, I. (2003) The problem of hypernegative supercoiling and R-loop formation in transcription. *Front Biosci*, **8**, D210-221.
- Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., Masse, E., Liu, L.F. and Crouch, R.J. (1995) Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* delta topA mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 3526-3530.
- Drolet, M, Wu, H.Y., and Liu,.L.F (1994). Roles of DNA Topoisomerases in Transcription. *Advance in Pharmacology Academic Press*. Vol. 29A. 135-145.

- Ellinger, T., Behnke, D., Bujard, H. and Gralla, J.D. (1994) Stalling of Escherichia coli RNA polymerase in the +6 to +12 region in vivo is associated with tight binding to consensus promoter elements. *J Mol Biol*, **239**, 455-465.
- Erie, D.A. (2002) The many conformational states of RNA polymerase elongation complexes and their roles in the regulation of transcription. *Biochim Biophys Acta*, **1577**, 224-239.
- Erie, D.A., Hajiseyedjavadi, O., Young, M.C. and von Hippel, P.H. (1993) Multiple RNA polymerase conformations and GreA: control of the fidelity of transcription. *Science*, **262**, 867-873.
- Fang, M. and Wu, H.Y. (1998) Suppression of leu-500 mutation in topA+ Salmonella typhimurium strains. The promoter relay at work. *J Biol Chem*, **273**, 29929-29934.
- Fang, M. and Wu, H.Y. (1998) A promoter relay mechanism for sequential gene activation. *J Bacteriol*, **180**, 626-633.
- Feng, G.H., Lee, D.N., Wang, D., Chan, C.L. and Landick, R. (1994) GreA-induced transcript cleavage in transcription complexes containing Escherichia coli RNA polymerase is controlled by multiple factors, including nascent transcript location and structure. *J Biol Chem*, **269**, 22282-22294.
- Figuroa, N. and Bossi, L. (1988) Transcription induces gyration of the DNA template in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 9416-9420.
- Fleischmann, G., Pflugfelder, G., Steiner, E.K., Javaherian, K., Howard, G.C., Wang, J.C. and Elgin, S.C. (1984) Drosophila DNA topoisomerase I is associated with transcriptionally active regions of the genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 6958-6962.

- Forterre, P., Bergerat, A. and Lopez-Garcia, P. (1996) The unique DNA topology and DNA topoisomerases of hyperthermophilic archaea. *FEMS Microbiol Rev*, **18**, 237-248.
- Foster, J.E., Holmes, S.F. and Erie, D.A. (2001) Allosteric binding of nucleoside triphosphates to RNA polymerase regulates transcription elongation. *Cell*, **106**, 243-252.
- Gaal, T., Bartlett, M.S., Ross, W., Turnbough, C.L., Jr. and Gourse, R.L. (1997) Transcription regulation by initiating NTP concentration: rRNA synthesis in bacteria. *Science*, **278**, 2092-2097.
- Gartenberg, M.R. and Wang, J.C. (1993) Identification of barriers to rotation of DNA segments in yeast from the topology of DNA rings excised by an inducible site-specific recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10514-10518.
- Gelles, J. and Landick, R. (1998) RNA polymerase as a molecular motor. *Cell*, **93**, 13-16.
- Gilmour, D.S., Pflugfelder, G., Wang, J.C. and Lis, J.T. (1986) Topoisomerase I interacts with transcribed regions in *Drosophila* cells. *Cell*, **44**, 401-407.
- Gonzalez-Barrera, S., Garcia-Rubio, M. and Aguilera, A. (2002) Transcription and double-strand breaks induce similar mitotic recombination events in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **162**, 603-614.
- Gopal, V., Brieba, L.G., Guajardo, R., McAllister, W.T. and Sousa, R. (1999) Characterization of structural features important for T7 RNAP elongation complex stability reveals competing complex conformations and a role for the non-template strand in RNA displacement. *J Mol Biol*, **290**, 411-431.
- Gralla, J.D., Carpousis, A.J. and Stefano, J.E. (1980) Productive and abortive initiation of transcription in vitro at the lac UV5 promoter. *Biochemistry*, **19**, 5864-5869.

- Grunberg-Manago, M. (1999) Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annu Rev Genet*, **33**, 193-227.
- Guipaud, O., Marguet, E., Noll, K.M., de la Tour, C.B. and Forterre, P. (1997) Both DNA gyrase and reverse gyrase are present in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10606-10611.
- Hammond, G.G., Cassidy, P.J. and Overbye, K.M. (1991) Novobiocin-dependent topA deletion mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **173**, 5564-5567.
- Hraiky, C., Raymond, M.A. and Drolet, M. (2000) RNase H overproduction corrects a defect at the level of transcription elongation during rRNA synthesis in the absence of DNA topoisomerase I in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **275**, 11257-11263.
- Hsu, L.M. (2002) Promoter clearance and escape in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta*, **1577**, 191-207.
- Hsu, L.M., Vo, N.V. and Chamberlin, M.J. (1995) *Escherichia coli* transcript cleavage factors GreA and GreB stimulate promoter escape and gene expression in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11588-11592.
- Ikeda, H. and Matsumoto, T. (1979) Transcription promotes recA-independent recombination mediated by DNA-dependent RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4571-4575.
- Iost, I. and Dreyfus, M. (1994) mRNAs can be stabilized by DEAD-box proteins. *Nature*, **372**, 193-196.
- Iost, I. and Dreyfus, M. (1995) The stability of *Escherichia coli* lacZ mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *EMBO J*, **14**, 3252-3261.



- Jones, P.G., Krah, R., Tafuri, S.R. and Wolffe, A.P. (1992) DNA gyrase, CS7.4, and the cold shock response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **174**, 5798-5802.
- Jung, S., Rajewsky, K. and Radbruch, A. (1993) Shutdown of class switch recombination by deletion of a switch region control element. *Science*, **259**, 984-987.
- Kampranis, S.C. and Maxwell, A. (1996) Conversion of DNA gyrase into a conventional type II topoisomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14416-14421.
- Karem, K. and Foster, J.W. (1993) The influence of DNA topology on the environmental regulation of a pH-regulated locus in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*, **10**, 75-86.
- Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S. and Suzuki, H. (1990) New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell*, **63**, 393-404.
- Kato, J., Nishimura, Y., Yamada, M., Suzuki, H. and Hirota, Y. (1988) Gene organization in the region containing a new gene involved in chromosome partition in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **170**, 3967-3977.
- Kato, J., Suzuki, H. and Ikeda, H. (1992) Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **267**, 25676-25684.
- Kireeva, M.L., Komissarova, N. and Kashlev, M. (2000) Overextended RNA:DNA hybrid as a negative regulator of RNA polymerase II processivity. *J Mol Biol*, **299**, 325-335.
- Kireeva, M.L., Komissarova, N., Waugh, D.S. and Kashlev, M. (2000) The 8-nucleotide-long RNA:DNA hybrid is a primary stability determinant of the RNA polymerase II elongation complex. *J Biol Chem*, **275**, 6530-6536.
- Kirkegaard, K. and Wang, J.C. (1985) Bacterial DNA topoisomerase I can relax

positively supercoiled DNA containing a single-stranded loop. *J Mol Biol*, **185**, 625-637.

Kogoma, T. (1986) RNase H-defective mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **166**, 361-363.

Kogoma, T., Skarstad, K., Boye, E., von Meyenburg, K. and Steen, H.B. (1985) RecA protein acts at the initiation of stable DNA replication in *rnh* mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, **163**, 439-444.

Kogoma, T., Subia, N.L. and von Meyenburg, K. (1985) Function of ribonuclease H in initiation of DNA replication in *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet*, **200**, 103-109.

Komissarova, N., Becker, J., Solter, S., Kireeva, M. and Kashlev, M. (2002) Shortening of RNA:DNA hybrid in the elongation complex of RNA polymerase is a prerequisite for transcription termination. *Mol Cell*, **10**, 1151-1162.

Komissarova, N. and Kashlev, M. (1997) Transcriptional arrest: *Escherichia coli* RNA polymerase translocates backward, leaving the 3' end of the RNA intact and extruded. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1755-1760.

Komissarova, N. and Kashlev, M. (1997) RNA polymerase switches between inactivated and activated states By translocating back and forth along the DNA and the RNA. *J Biol Chem*, **272**, 15329-15338.

Korzheva, N. and Mustaev, A. (2001) Transcription elongation complex: structure and function. *Curr Opin Microbiol*, **4**, 119-125.

Korzheva, N., Mustaev, A., Kozlov, M., Malhotra, A., Nikiforov, V., Goldfarb, A. and Darst, S.A. (2000) A structural model of transcription elongation. *Science*, **289**, 619-625.

Krasilnikov, A.S., Podtelezchnikov, A., Vologodskii, A. and Mirkin, S.M. (1999) Large-

scale effects of transcriptional DNA supercoiling in vivo. *J Mol Biol*, **292**, 1149-1160.

Krummel, B. and Chamberlin, M.J. (1992) Structural analysis of ternary complexes of Escherichia coli RNA polymerase. Deoxyribonuclease I footprinting of defined complexes. *J Mol Biol*, **225**, 239-250.

Landick, R. (1997) RNA polymerase slides home: pause and termination site recognition. *Cell*, **88**, 741-744.

Lee, D.N. and Landick, R. (1992) Structure of RNA and DNA chains in paused transcription complexes containing Escherichia coli RNA polymerase. *J Mol Biol*, **228**, 759-777.

Leng, F. and McMacken, R. (2002) Potent stimulation of transcription-coupled DNA supercoiling by sequence-specific DNA-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 9139-9144.

Lesley, S.A., Jovanovich, S.B., Tse-Dinh, Y.C. and Burgess, R.R. (1990) Identification of a heat shock promoter in the topA gene of Escherichia coli. *J Bacteriol*, **172**, 6871-6874.

Lewin, B., (1994) *Genes V Oxford University Press and Cell Press*.

Liu, L.F. and Wang, J.C. (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7024-7027.

Lodge, J.K., Kazic, T. and Berg, D.E. (1989) Formation of supercoiling domains in plasmid pBR322. *J Bacteriol*, **171**, 2181-2187.

Lopez, P.J., Marchand, I., Yarchuk, O. and Dreyfus, M. (1998) Translation inhibitors stabilize Escherichia coli mRNAs independently of ribosome protection. *Proc Natl Acad*

*Sci U S A*, **95**, 6067-6072.

Lopez-Garcia, P. (1999) DNA supercoiling and temperature adaptation: A clue to early diversification of life? *J Mol Evol*, **49**, 439-452.

Lopez-Garcia, P. and Forterre, P. (1997) DNA topology in hyperthermophilic archaea: reference states and their variation with growth phase, growth temperature, and temperature stresses. *Mol Microbiol*, **23**, 1267-1279.

Lynch, A.S. and Wang, J.C. (1993) Anchoring of DNA to the bacterial cytoplasmic membrane through cotranscriptional synthesis of polypeptides encoding membrane proteins or proteins for export: a mechanism of plasmid hypernegative supercoiling in mutants deficient in DNA topoisomerase I. *J Bacteriol*, **175**, 1645-1655.

Margolin, P., Zumstein, L., Sternglanz, R. and Wang, J.C. (1985) The Escherichia coli supX locus is topA, the structural gene for DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 5437-5441.

Masse, E. and Drolet, M. (1999a) Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of Escherichia coli DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, **274**, 16654-16658.

Masse, E. and Drolet, M. (1999b) R-loop-dependent hypernegative supercoiling in Escherichia coli topA mutants preferentially occurs at low temperatures and correlates with growth inhibition. *J Mol Biol*, **294**, 321-332.

Masse, E. and Drolet, M. (1999c) Escherichia coli DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J Biol Chem*, **274**, 16659-16664.

Masse, E., Phoenix, P. and Drolet, M. (1997) DNA topoisomerases regulate R-loop

formation during transcription of the *rrnB* operon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **272**, 12816-12823.

Masukata, H., Dasgupta, S. and Tomizawa, J. (1987) Transcriptional activation of ColE1 DNA synthesis by displacement of the nontranscribed strand. *Cell*, **51**, 1123-1130.

Meiklejohn, A.L. and Gralla, J.D. (1989) Activation of the *lac* promoter and its variants. Synergistic effects of catabolite activator protein and supercoiling in vitro. *J Mol Biol*, **207**, 661-673.

Menzel, R. and Gellert, M. (1983) Regulation of the genes for *E. coli* DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling. *Cell*, **34**, 105-113.

Mirabella, A. and Gartenberg, M.R. (1997) Yeast telomeric sequences function as chromosomal anchorage points in vivo. *EMBO J*, **16**, 523-533.

Mizushima, T., Kataoka, K., Ogata, Y., Inoue, R. and Sekimizu, K. (1997) Increase in negative supercoiling of plasmid DNA in *Escherichia coli* exposed to cold shock. *Mol Microbiol*, **23**, 381-386.

Mizushima, T., Natori, S. and Sekimizu, K. (1993) Relaxation of supercoiled DNA associated with induction of heat shock proteins in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, **238**, 1-5.

Mooney, R.A., Artsimovitch, I. and Landick, R. (1998) Information processing by RNA polymerase: recognition of regulatory signals during RNA chain elongation. *J Bacteriol*, **180**, 3265-3275.

Nierlich, D.P. and Murakawa, G.J. (1996) The decay of bacterial messenger RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **52**, 153-216.

Nudler, E., Avetissova, E., Markovtsov, V. and Goldfarb, A. (1996) Transcription processivity: protein-DNA interactions holding together the elongation complex. *Science*, **273**, 211-217.

Nudler, E., Goldfarb, A. and Kashlev, M. (1994) Discontinuous mechanism of transcription elongation. *Science*, **265**, 793-796.

Nudler, E., Mustaev, A., Lukhtanov, E. and Goldfarb, A. (1997) The RNA-DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase. *Cell*, **89**, 33-41.

Ogata, Y., Mizushima, T., Kataoka, K., Miki, T. and Sekimizu, K. (1994) Identification of DNA topoisomerases involved in immediate and transient DNA relaxation induced by heat shock in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, **244**, 451-455.

Ogawa, T., Pickett, G.G., Kogoma, T. and Kornberg, A. (1984) RNase H confers specificity in the dnaA-dependent initiation of replication at the unique origin of the *Escherichia coli* chromosome in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 1040-1044.

Ostrander, E.A., Benedetti, P. and Wang, J.C. (1990) Template supercoiling by a chimera of yeast GAL4 protein and phage T7 RNA polymerase. *Science*, **249**, 1261-1265.

Palangat, M. and Landick, R. (2001) Roles of RNA:DNA hybrid stability, RNA structure, and active site conformation in pausing by human RNA polymerase II. *J Mol Biol*, **311**, 265-282.

Peterson C. (1993) Translation and mRNA stability in bacteria: a complex relationship. Control of mRNA stability. Belasco J.G., Brawerman G., eds. (1993) New York: Academic

- Phoenix, P., Raymond, M.A., Masse, E. and Drolet, M. (1997) Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation in vitro. *J Biol Chem*, **272**, 1473-1479.
- Pruss, G.J. (1985) DNA topoisomerase I mutants. Increased heterogeneity in linking number and other replicon-dependent changes in DNA supercoiling. *J Mol Biol*, **185**, 51-63.
- Pruss, G.J. and Drlica, K. (1985) DNA supercoiling and suppression of the leu-500 promoter mutation. *J Bacteriol*, **164**, 947-949.
- Pruss, G.J. and Drlica, K. (1986) Topoisomerase I mutants: the gene on pBR322 that encodes resistance to tetracycline affects plasmid DNA supercoiling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 8952-8956.
- Pruss, G.J., Manes, S.H. and Drlica, K. (1982) Escherichia coli DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell*, **31**, 35-42.
- Qi, H., Menzel, R. and Tse-Dinh, Y.C. (1996) Effect of the deletion of the sigma 32-dependent promoter (P1) of the Escherichia coli topoisomerase I gene on thermotolerance. *Mol Microbiol*, **21**, 703-711.
- Qi, H., Menzel, R. and Tse-Dinh, Y.C. (1997) Regulation of Escherichia coli topA gene transcription: involvement of a sigmaS-dependent promoter. *J Mol Biol*, **267**, 481-489.
- Qi, H., Menzel, R. and Tse-Dinh, Y.C. (1999) Increased thermosensitivity associated with topoisomerase I deletion and promoter mutations in Escherichia coli. *FEMS Microbiol Lett*, **178**, 141-146.

- Quinones, A., Kucherer, C., Piechocki, R. and Messer, W. (1987) Reduced transcription of the *rnh* gene in *Escherichia coli* mutants expressing the SOS regulon constitutively. *Mol Gen Genet*, **206**, 95-100.
- Rahmouni, A.R. and Wells, R.D. (1992) Direct evidence for the effect of transcription on local DNA supercoiling in vivo. *J Mol Biol*, **223**, 131-144.
- Rahmouni, A.R. and Wells, R.D. (1992) Direct evidence for the effect of transcription on local DNA supercoiling in vivo. *J Mol Biol*, **223**, 131-144.
- Rice, G.A., Kane, C.M. and Chamberlin, M.J. (1991) Footprinting analysis of mammalian RNA polymerase II along its transcript: an alternative view of transcription elongation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 4245-4249.
- Richardson, J.P. (1975) Initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase from supercoiled and non-supercoiled bacteriophage PM2 DNA. *J Mol Biol*, **91**, 477-487.
- Richardson, J.P. (1975) Attachment of nascent RNA molecules to superhelical DNA. *J Mol Biol*, **98**, 565-579.
- Ring, B.Z., Yarnell, W.S. and Roberts, J.W. (1996) Function of *E. coli* RNA polymerase sigma factor sigma 70 in promoter-proximal pausing. *Cell*, **86**, 485-493.
- Roberts, J.W. (1996) Transcription control and its regulation. Lin, E., and Lynch, A. (ed.), *Regulation of the gene expression in E. coli*. R. G. Landes Co., Austin, Tex. 27-44.
- Rosenberg, S.M. (1997) Mutation for survival. *Curr Opin Genet Dev*, **7**, 829-834.
- Rui, S. and Tse-Dinh, Y.C. (2003) Topoisomerase function during bacterial responses to environmental challenge. *Front Biosci*, **8**, D256-263.



Saucier, J.M. and Wang, J.C. (1972) Angular alteration of the DNA helix by E. coli RNA polymerase. *Nat New Biol*, **239**, 167-170

Schultz, M.C., Brill, S.J., Ju, Q., Sternglanz, R. and Reeder, R.H. (1992) Topoisomerases and yeast rRNA transcription: negative supercoiling stimulates initiation and topoisomerase activity is required for elongation. *Genes Dev*, **6**, 1332-1341.

Sidorenkov, I., Komissarova, N. and Kashlev, M. (1998) Crucial role of the RNA:DNA hybrid in the processivity of transcription. *Mol Cell*, **2**, 55-64.

Silverstone, A.E., Arditti, R.R. and Magasanik, B. (1970) Catabolite-insensitive revertants of lac promoter mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **66**, 773-779.

Stewart, A.F., Herrera, R.E. and Nordheim, A. (1990) Rapid induction of c-fos transcription reveals quantitative linkage of RNA polymerase II and DNA topoisomerase I enzyme activities. *Cell*, **60**, 141-149.

Strainic, M.G., Jr., Sullivan, J.J., Velevis, A. and deHaseth, P.L. (1998) Promoter recognition by Escherichia coli RNA polymerase: effects of the UP element on open complex formation and promoter clearance. *Biochemistry*, **37**, 18074-18080.

Straney, D.C., Straney, S.B. and Crothers, D.M. (1989) Synergy between Escherichia coli CAP protein and RNA polymerase in the lac promoter open complex. *J Mol Biol*, **206**, 41-57.

Surratt, C.K., Milan, S.C. and Chamberlin, M.J. (1991) Spontaneous cleavage of RNA in ternary complexes of Escherichia coli RNA polymerase and its significance for the mechanism of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 7983-7987.

Tomizawa, J. and Masukata, H. (1987) Factor-independent termination of transcription in a stretch of deoxyadenosine residues in the template DNA. *Cell*, **51**, 623-630.

- Torrey, T.A., Atlung, T. and Kogoma, T. (1984) dnaA suppressor (dasF) mutants of Escherichia coli are stable DNA replication (sdrA/rnh) mutants. *Mol Gen Genet*, **196**, 350-355.
- Toulokxonov, I., Artsimovitch, I. and Landick, R. (2001) Allosteric control of RNA polymerase by a site that contacts nascent RNA hairpins. *Science*, **292**, 730-733.
- Trigueros, S. and Roca, J. (2001) Circular minichromosomes become highly recombinogenic in topoisomerase-deficient yeast cells. *J Biol Chem*, **276**, 2243-2248.
- Trucksis, M. and Depew, R.E. (1981) Identification and localization of a gene that specifies production of Escherichia coli DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 2164-2168.
- Trucksis, M., Golub, E.I., Zabel, D.J. and Depew, R.E. (1981) Escherichia coli and Salmonella typhimurium supX genes specify deoxyribonucleic acid topoisomerase I. *J Bacteriol*, **147**, 679-681.
- Tsao, Y.P., Wu, H.Y. and Liu, L.F. (1989) Transcription-driven supercoiling of DNA: direct biochemical evidence from in vitro studies. *Cell*, **56**, 111-118.
- Tse-Dinh, Y.C. (2000) Increased sensitivity to oxidative challenges associated with topA deletion in Escherichia coli. *J Bacteriol*, **182**, 829-832.
- Vilette, D., Ehrlich, S.D. and Michel, B. (1995) Transcription-induced deletions in Escherichia coli plasmids. *Mol Microbiol*, **17**, 493-504.
- von Meyenburg, K., Boye, E., Skarstad, K., Koppes, L. and Kogoma, T. (1987) Mode of initiation of constitutive stable DNA replication in RNase H-defective mutants of Escherichia coli K-12. *J Bacteriol*, **169**, 2650-2658.

Wang, J.C. (1971) Interaction between DNA and an Escherichia coli protein omega. *J Mol Biol*, **55**, 523-533.

Wang, J.C. (1996) DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem*, **65**, 635-692.

Wang, J.Y. and Syvanen, M. (1992) DNA twist as a transcriptional sensor for environmental changes. *Mol Microbiol*, **6**, 1861-1866.

Wang, Z. and Droge, P. (1997) Long-range effects in a supercoiled DNA domain generated by transcription in vitro. *J Mol Biol*, **271**, 499-510.

Weinstein-Fischer, D., Elgrably-Weiss, M. and Altuvia, S. (2000) Escherichia coli response to hydrogen peroxide: a role for DNA supercoiling, topoisomerase I and Fis. *Mol Microbiol*, **35**, 1413-1420.

Wright, B.E., Longacre, A. and Reimers, J.M. (1999) Hypermutation in derepressed operons of Escherichia coli K12. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5089-5094.

Wu, H.Y. and Liu, L.F. (1991) DNA looping alters local DNA conformation during transcription. *J Mol Biol*, **219**, 615-622.

Wu, H.Y., Shyy, S.H., Wang, J.C. and Liu, L.F. (1988) Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell*, **53**, 433-440.

Wu, H.Y., Tan, J. and Fang, M. (1995) Long-range interaction between two promoters: activation of the leu-500 promoter by a distant upstream promoter. *Cell*, **82**, 445-451.

Yager, T.D. and von Hippel, P.H. (1991) A thermodynamic analysis of RNA transcript elongation and termination in Escherichia coli. *Biochemistry*, **30**, 1097-1118.

Yager, T.D., and von Hippel. P.H (1987) Transcript elongation and termination in Escherichia coli.. Neidhardt F.C., Ingraham, J.L. Low, K.B. Magasanik B., Schaechter, M., and. Umbarger H.E (ed.), Escherichia coli and Salmonella typhimurium: *cellular and molecular biology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.1241-1275

Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B., Bachellier, S., Schneider, R., Chen, D., Lilley, D.M. and Cozzarelli, N.R. (2000) Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA s supercoiling in Escherichia coli. *J Biol Chem*, **275**, 8103-8113.

Zhang, H., Wang, J.C. and Liu, L.F. (1988) Involvement of DNA topoisomerase I in transcription of human ribosomal RNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 1060-1064.

## 9 REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont en premier lieu à mon directeur de maîtrise, Marc Drolet, grâce à qui ce travail a été pour moi des plus intéressant et des plus stimulant. Il m'a également donné l'envie, la confiance et le courage pour poursuivre mes études.

J'aimerais également remercier tous les autres étudiants de laboratoire, avec qui j'ai partagé à travers la passion de la science, des moments inoubliables :

Hraiky Chadi

Sonia Broccoli

Fortin Charles

Rallu Fabien

Desaberais Julie-Anick

Sanscartier Patrick

Et bien sûr tous les autres voisins du département

À qui je souhaite une bonne continuation et du succès dans leurs études.