

2m11.2949.4

Université de Montréal

Clonage et caractérisation du gène *xerD* de *Lactobacillus casei*

par

Jean-Frédéric Flandin

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 es sciences (M. Sc.)  
en microbiologie

Août, 2001

©Jean-Frédéric Flandin, 2001



W

4

U58

2002

V.047

2002  
U58

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Clonage et caractérisation du gène *xerD* de *Lactobacillus casei*

présenté par :  
Jean-Frédéric Flandin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

.....Dr Marc Drolet.....  
président-rapporteur

.....Dr George Szatmari.....  
directeur de recherche

.....Dre Josée Harel.....  
membre du jury

## Résumé

Le système de recombinaison à spécificité de site de type Xer permet, par la reconnaissance de courtes séquences, la monomérisation des chromosomes et des plasmides afin d'assurer une partition adéquate du matériel génétique dans les cellules-filles. Les deux recombinases XerC et XerD interagissent ensemble pour médier l'échange des quatre brins d'ADN avec la formation d'une jonction d'Holliday comme intermédiaire obligatoire. Étant donné que les plasmides sont difficilement maintenus chez les bactéries lactiques, les gènes plasmidiques seraient mieux transmis dans les cellules-filles s'ils étaient insérés dans le chromosome. Les études de ce mémoire ont permis de séquencer et caractériser le gène *xerD* de *Lactobacillus caseii*. Elles ont montré que la recombinase XerD se lie aux sites chromosomiques de *E. coli* et *B. subtilis* seul ou en coopération avec XerC de *E. coli*. Cependant, aucune activité topoisomérasique n'a été trouvée sur un plasmide contenant deux sites directement répétés de *E. coli*.

Mots clés : Recombinaison spécifique de site/ Lambda-intégrase/ XerD/

*Lactobacillus caseii*/ Division cellulaire

## Summary

Xer site-specific recombination allows, by the recognition of small specific sequences, the monomerisation of chromosome and plasmid multimers, thereby assures a proper segregation of the genetic material. Two related recombinases, XerC and XerD, work in cooperativity to mediate the exchange of the four strands with the Holliday junction as an obligatory intermediate. Lactic acid bacteria have a lot of important genes on their plasmids and these bacteria tend to possess many multimers, resulting in a frequent loss of the information. These genes would be better segregated if they were on the chromosome. I was able to completely sequence the *xerD* gene of *Lactobacillus caseii* and purify the corresponding protein in order to characterize this recombinase. The experiments showed that XerD could bind the chromosomal site of *E. coli* and *B. subtilis* either alone or in cooperativity with *E. coli* XerC. However, no topoisomerase activity was noticed on a supercoiled plasmid containing two directly repeated sites of *E. coli*.

Keywords : Site-specific recombination/ Lambda-integrase/ XerD/ *Lactobacillus caseii*/ Cell division

## Table des matières

PAGE TITRE.....	i
IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
SUMMARY.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et abréviations.....	xii
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1. LA RECOMBINAISON SPÉCIFIQUE DE SITE.....	1
1.1. LES RÉSOVLASES-INVERTASES.....	3
1.2. LES LAMBDA-INTÉGRASES.....	4
1.2.1. MOTIFS CONSERVÉS.....	4
1.2.2. CLIVAGE EN <i>CIS</i> ET EN <i>TRANS</i> .....	6
2. LA RECOMBINAISON À SPÉCIFICITÉ DE SITE DE TYPE XER.....	9
2.1. GÉNÉRALITÉS.....	9
2.2. XERC ET XERD.....	10
2.2.1. DES GÈNES CONSERVÉS.....	10
2.2.2. ACTIVITÉ CATALYTIQUE ET TOPOISOMÉRASIQUE.....	12
2.3. XERC.....	13

2.4. XERD.....	15
2.4.1. STRUCTURE CRISTALLISÉE.....	15
3. LES SITES D' ACTIONS.....	17
3.1. GÉNÉRALITÉS.....	17
3.2. SITE <i>DIF</i> .....	19
3.2.1. <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	19
3.2.1.1. TERMINUS DU CHROMOSOME.....	19
3.2.1.2. STRUCTURE.....	21
3.2.2. <i>BACILLUS SUBTILIS</i> .....	22
3.3. SITES PLASMIDIQUES.....	23
3.3.1. DISTRIBUTION DES PLASMIDES.....	23
3.3.2. SITE <i>CER</i> DE <i>COLE1</i> .....	24
3.3.2.1. RCD.....	24
4. LES FACTEURS ACCESSOIRES.....	25
4.1. FtsK.....	26
4.1.1. RÔLE DANS LA RECOMBINAISON.....	27
4.2. ARGR.....	28
4.3. PEPA.....	32
5. LA DIVISION CELLULAIRE.....	35
5.1. EN TEMPS NORMAL.....	35
5.2. DIMÈRES CHROMOSOMIQUES.....	39
5.3. MUTANTS DE RÉOLUTION.....	42
6. LES BACTÉRIES LACTIQUES.....	43

6.1. <i>LACTOBACILLUS CASEII</i> .....	44
7. PROJET DE MAÎTRISE.....	45
<b>CHAPITRE 2 : ARTICLE.....</b>	<b>47</b>
ABSTRACT.....	48
1. INTRODUCTION.....	49
2. MATERIALS AND METHODS.....	51
2.1. BACTERIAL STRAINS AND PLASMIDS.....	51
2.2. GROWTH CONDITIONS AND DNA MANIPULATIONS.....	52
2.3. PCR CONDITIONS.....	53
2.4. PROTEIN OVEREXPRESSION.....	54
2.5. DNA-BINDING ASSAY.....	54
2.6. IN VITRO RELAXATION REACTIONS.....	55
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	56
3.1. CLONING OF <i>LACTOBACILLUS CASEII XERD</i> GENE AND ANALYSIS OF THE SEQUENCE.....	56
3.2. DNA BINDING ACTIVITY.....	57
3.3. CO-OPERATIVE BINDING.....	59
3.4. TOPOISOMERASE ACTIVITY.....	60
4. CONCLUSION.....	61
5. REFERENCES.....	63
<b>CHAPITRE 3 : DISCUSSION.....</b>	<b>75</b>
1. LE CLONAGE DU GÈNE <i>XERD</i> DE <i>LACTOBACILLUS CASEII</i> .....	75
2. LIAISON À L'ADN.....	79

3. LIAISON COOPÉRATIVE.....	81
4. ACTIVITÉ TOPOISOMÉRASIQUE.....	82
5. AUTRES EXPÉRIENCES.....	83
6. PERSPECTIVES.....	84
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>86</b>
ANNEXE 1 : SÉQUENCE EN NUCLÉOTIDES ET EN ACIDES AMINÉS	
DE <i>L. CASEII XERD</i> .....	xv
REMERCIEMENTS.....	xvii

## Liste des Tableaux

TABLEAU I : PRÉSENCE DE GÈNES HOMOLOGUES AUX RECOMBINASES XER ET À FTSK.....	11
TABLEAU II : ALIGNEMENT DE PLUSIEURS SITES DE RECOMBINAISON DE TYPE XER.....	18

## Liste des figures

### INTRODUCTION

FIGURE 1 : DIFFÉRENTES POSSIBILITÉS DE LA RECOMBINAISON SPÉCIFIQUE DE SITE.....	2
FIGURE 2 : MODE D'ACTION DES RÉSOVLASES-INVERTASES.....	5
FIGURE 3 : CLIVAGE EN <i>CIS</i> ET EN <i>TRANS</i> .....	7
FIGURE 4 : STRUCTURE CRISTALLISÉE DE XERD DE <i>E. COLI</i> .....	16
FIGURE 5 : LA DISTRIBUTION DU MOTIF RRNAGGGS.....	20
FIGURE 6 : REPRÉSENTATION DU SITE DE LIAISON DE ARGR.....	29
FIGURE 7 : MODÈLE DE LIAISON À L'ADN DE BSTARGR.....	31
FIGURE 8 : COMPLEXE SYNAPTIQUE ENTRE DEUX SITES <i>CER</i> .....	34
FIGURE 9 : REPRÉSENTATION DES SITES D'ORIGINE ET DE TERMINAISON DE RÉPLICATION DU CHROMOSOME.....	36
FIGURE 10 : MODÈLE DE LA SÉGRÉGATION DU CHROMOSOME.....	38
FIGURE 11 : MODÈLE DE L'ACTIVATION ET DE L'INHIBITION DE L'ACTIVITÉ CATALYTIQUE DES XER.....	41

### ARTICLE

FIGURE 1 : ALIGNMENT OF <i>E. COLI</i> XERD, <i>B. SUBTILIS</i> RIPX AND <i>L. CASEII</i> XERD PROTEINS.....	69
---	----

FIGURE 2 : DNA BINDING ASSAY OF <i>L. CASEII</i> XERD WITH <i>E. COLI</i> AND <i>B. SUBTILIS</i> DIF SITES.....	70
FIGURE 3 : CO-OPERATIVE INTERACTIONS BETWEEN <i>L. CASEII</i> XERD AND <i>E. COLI</i> XERC ON <i>E. COLI</i> AND <i>B. SUBTILIS</i> DIF SITES.....	72
FIGURE 4 : TOPOISOMERASE ACTIVITY OF <i>L. CASEII</i> XERD.....	74
<b>DISCUSSION</b>	
FIGURE 12 : AMORCES UTILISÉES POUR L'AMPLIFICATION DU GÈNE <i>XERD</i> DE <i>L. CASEII</i> .....	76
FIGURE 13 : INDUCTION ET PURIFICATION DE LCXERD.....	78

## Liste des sigles et abréviations

### ACIDES AMINÉS

A : ALANINE

C : cystéine

D : acide aspartique

E : acide glutamique

F : phénylalanine

G : glycine

H : histidine

I : isoleucine

K : lysine

L : leucine

M : méthionine

N : asparagine

P : proline

Q : glutamine

R : arginine

S : sérine

T : thréonine

V : valine

W : tryptophane

Y : tyrosine

### ACIDES NUCLÉIQUES

A : adénine

C : cytosine

G : guanine

N : n'importe quel nucléotide

R : purine (adénine ou guanine)

S : cytosine ou guanine

T : thymine

U : uracile

### UNITÉS DE MESURE

Å : Angström ( $10^{-10}$  mètre)

aa : acide aminé

cm : centimètre

Da : Dalton

g : gramme

h : heure

kb : kilobase

kDa : kilodalton

µg : microgramme

µL : microlitre

µM : micromolaire

min : minute	ATP : adénosine triphosphate
mL : millilitre	ATPase : adénosine triphosphatase
mM : millimolaire	$\beta$ : bêta
ng : nanogramme	BSA : albumine de sérum de bœuf
nt : nucléotide	BsCodV : CodV de <i>Bacillus subtilis</i>
pb : paires de bases	Bsdif : dif de <i>Bacillus subtilis</i>
pmol : picomole	BsRipX : RipX de <i>Bacillus subtilis</i>
s : seconde	BstArgR : ArgR de <i>Bacillus</i>
U : unité(s)	<i>Staerothermophilus</i>
V/cm : Volt par centimètre	chap : chapitre
Xg : vitesse de centrifugation	$\chi$ : chi
°C : degré Celsius	cm : chloramphénicol
AUTRES	C-terminal : carboxy-terminal
3'OH : trois prime hydroxyle	$\delta$ ou $\Delta$ : delta
3'PO <sub>4</sub> : trois prime phosphate	DIG : digoxygénine
5'OH : cinq prime hydroxyle	DNase I : désoxyribonucléase I
$\alpha$ : alpha	DTT : dithiothreitol
ADN : acide désoxyribonucléique	Ecdif : dif de <i>Escherichia coli</i>
Ap : ampicilline	EcXerC : XerC de <i>Escherichia coli</i>
ARN : acide ribonucléique	EcXerD : XerD de <i>Escherichia coli</i>
ARN <sub>t</sub> : acide ribonucléique de	EDTA : acide
transfert	éthylènediaminetétraacétique
	fig : figure

$\gamma$ : gamma	<i>orf</i> : cadre de lecture ouvert
GTPase : guanosine triphosphate	PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide
IPTG : isopropyl $\beta$ -D- thiogalactopyranoside	PCR : réaction de polymérisation en chaîne
kn : kanamycine	SDS : sodium dodécyl sulfate
LB : Luria-Bertani	<i>sp.</i> : espèce
Lcdif : <i>dif</i> de <i>Lactobacillus caseii</i>	TBE : tampon tris-borate-EDTA
LcXerD : XerD de <i>Lactobacillus</i> <i>caseii</i>	Tc : tétracycline
$\lambda$ : lambda	Tn : transposon
$\lambda$ Int : Intégrase du phage lambda	Tp : triméthoprim
MBP : protéine se liant au maltose	UV : ultraviolet
MgCl <sub>2</sub> : chlorure de magnésium	
Mn <sup>2+</sup> : ion manganèse	
MRS : de Man Rogosa Sharpe	
NaCl : chlorure de sodium	
NEB : New England Biolabs	
Ni-NTA : nickel-nitrilotriacétique	
N-terminal : amino-terminal	
OD <sub>600</sub> : densité optique à 600 nanomètres	
OGM : organismes génétiquement modifiés	

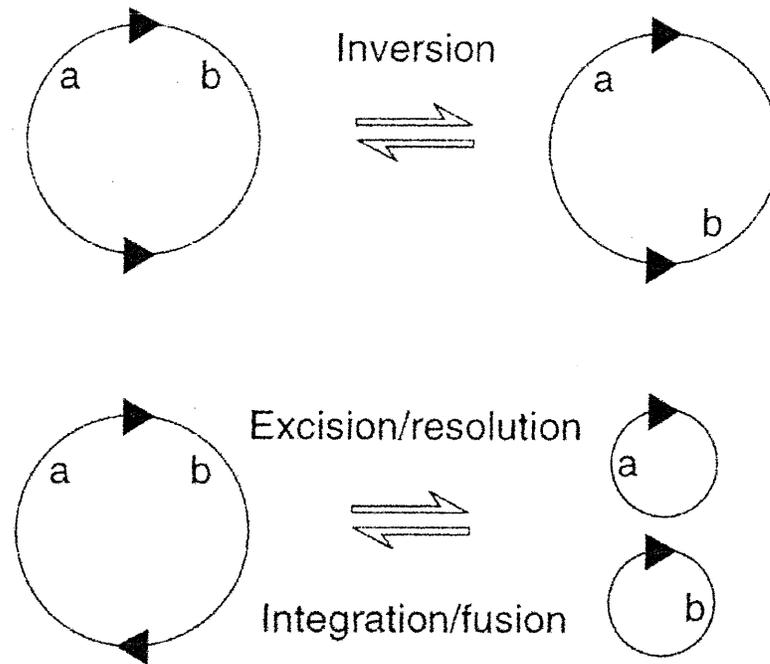
# Chapitre 1

## Introduction

### 1. LA RECOMBINAISON SPÉCIFIQUE DE SITE

La recombinaison à spécificité de site joue un rôle essentiel dans le cycle cellulaire d'un grand nombre de bactériophages, bactéries, levures et même de cellules de mammifères. Ce système permet l'intégration ou l'excision d'ADN viral ou plasmidique du chromosome, la transposition conjugative, la résolution de caténanes d'ADN, la régulation du nombre de copies plasmidiques, l'hypervariabilité des immunoglobulines et les inversions d'ADN contrôlant l'expression des protéines de surface des cellules, soit en inversant le promoteur ou en joignant des parties C-terminales variables à une région N-terminale constante (Nunes-Düby *et al.*, 1998).

Ce type de recombinaison se distingue de la recombinaison générale par le fait que les brins ne sont pas échangés par la reconnaissance d'une forte homologie entre eux mais par la présence de courtes séquences spécifiques asymétriques. La séquence nucléotidique des sites de recombinaison engendre une orientation polaire de ceux-ci, ce qui influence le résultat final. En effet, quand les sites sont inversement répétés, la réaction résulte en une inversion alors qu'on obtient une résolution, une intégration ou une excision quand les sites sont directement répétés (Sadowski, 1986 et Figure 1). De plus, cette réaction est conservatrice car il n'y a ni gain ni perte de nucléotides, il y a absence de réplication et ne nécessite pas de cofacteurs énergétiques supplémentaires comme



**Figure 1 :** Différentes possibilités de la recombinaison spécifique de site. Les triangles représentent l'orientation des sites de recombinaison. Les lettres a et b indiquent la position de marqueurs génétiques distincts. Les réactions d'excision et d'intégration peuvent survenir entre des fragments de taille et/ou de fonctions différentes (ex chromosome et phage) alors que les réactions de résolution et de fusion ont lieu entre deux molécules équivalentes d'ADN (ex deux plasmides). Figure tirée de Hallet et Sherratt (1997).

l'ATP : l'énergie du pont phosphodiester étant conservée pour la formation du nouveau lien (Mizuuchi, 1992; Nash, 1996).

Étant donné que ce type de recombinaison permet de bien cibler des zones spécifiques du chromosome et qu'il est facile, en utilisant les protéines accessoires appropriées, de permettre seulement la recombinaison intégrative, elle est de plus en plus utilisée dans le génie génétique pour favoriser l'entrée de gènes exogènes (Martin *et al.*, 2000; Thyagarajan *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2000; Life Science Biotechnologies). Les recombinases à spécificité de site sont divisées en deux familles distinctes : les résolvases-invertases et les  $\lambda$ -intégrases.

### 1.1. LES RÉSOLVASES-INVERTASES

Les recombinases de la famille des résolvases-invertases forment un groupe assez homogène d'environ 40 protéines dont les plus connues sont les résolvases des transposons Tn3 et  $\gamma\delta$  ainsi que les systèmes d'inversion Gin/*gix* du bactériophage Mu et Hin/*hix* de *Salmonella sp.* Malgré les différents rôles biologiques, environ 13% des acides aminés sont conservés chez tous les membres de cette famille (Hatfull et Grindley, 1988). Ces recombinases sont caractérisées par le fait qu'elles requièrent le surenroulement de l'ADN selon une topologie particulière permettant seulement la recombinaison intramoléculaire, le site d'enjambement, où a lieu l'échange des brins, n'est que de deux pb et l'attaque nucléophile se fait par une sérine, libérant une extrémité 3'OH alors que la sérine est liée à l'extrémité 5'phosphate (Nash, 1996). De plus, lors de la

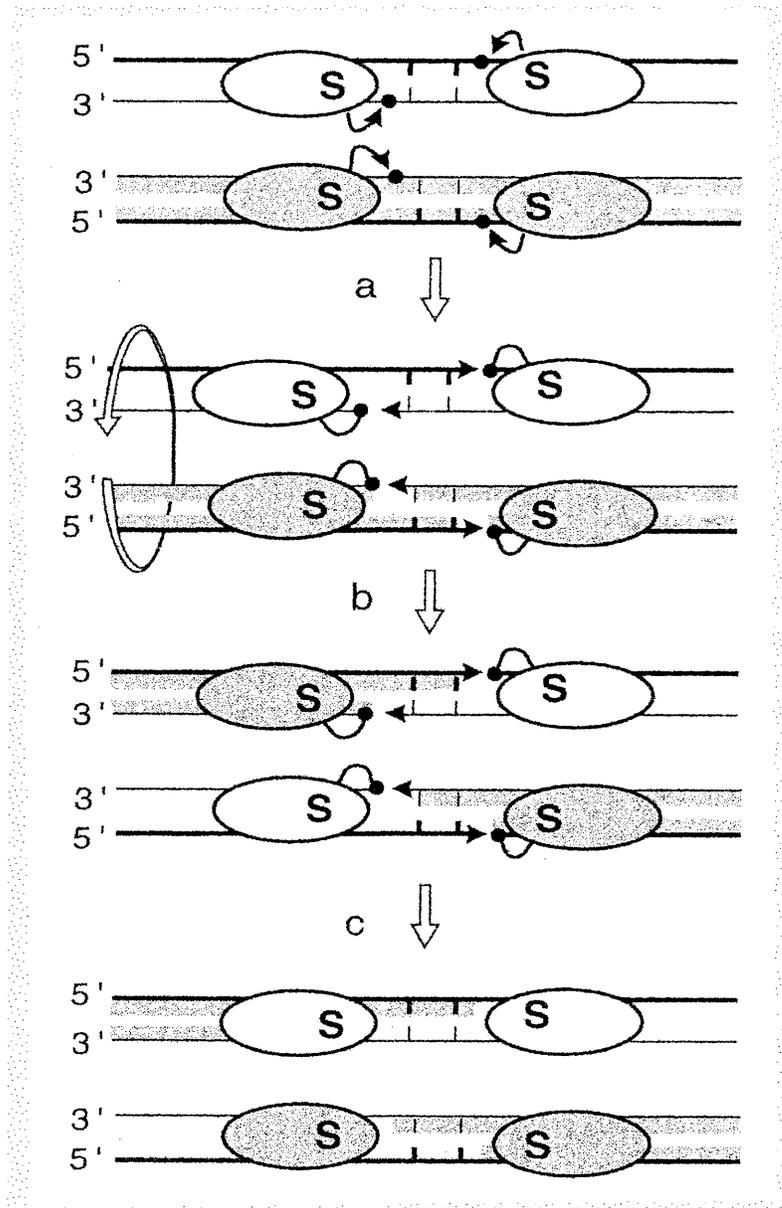
réaction de recombinaison, le clivage et l'échange des quatre brins se font simultanément et d'une façon concertée (Hallet et Sherratt, 1997 et Figure 2).

## 1.2. LES LAMBDA-INTÉGRASES

La famille des  $\lambda$ -intégrases comprend plus de 130 membres formant un groupe très hétéroclite, possédant seulement quatre résidus invariables, soit RHRY, et trois motifs conservés. Les membres les plus connus sont, en plus de l'intégrase du phage lambda ( $\lambda$ Int), la protéine Cre du phage P1, Flp de *Saccharomyces sp.* ainsi que les recombinases XerC et XerD. Tous les membres de cette famille permettent autant la recombinaison inter- qu'intramoléculaire, possèdent un site d'enjambement de six à huit pb et l'attaque nucléophile se fait par une tyrosine, libérant une extrémité 5'OH. La réaction de recombinaison complète nécessite deux réactions de transestérification pour l'échange des quatre brins avec la formation d'une jonction d'Holliday comme intermédiaire obligatoire. De plus, toutes ces recombinases possèdent une activité topoisomérasique (Nash, 1996; Crisona *et al.*, 1999; Grainge et Jayaram, 1999).

### 1.2.1. MOTIFS CONSERVÉS

L'intégrase du phage  $\lambda$  est bien sur la recombinase la plus connue et la plus étudiée de cette famille.  $\lambda$ Int est une protéine basique de 40 kDa dont le petit domaine N-terminal (résidus 1 à 64) permet la liaison, à haute affinité, avec l'ADN et les interactions entre les protéines, ce qui module l'activité de l'intégrase alors que le domaine C-terminal (résidus 65 à 356), qui se superpose



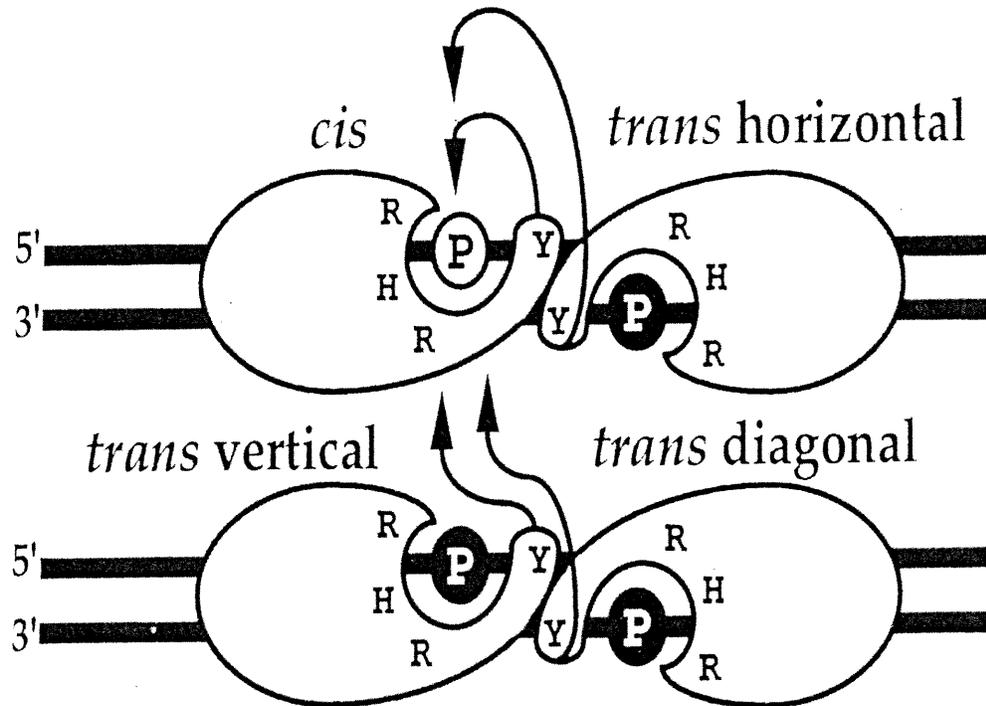
**Figure 2 :** Mode d'actions des résolvases-invertases. Les lignes larges et minces représentent respectivement les brins supérieurs et inférieurs alors que les lignes verticales indiquent la région d'espacement de deux pb. Les flèches noires montrent l'attaque nucléophile par la sérine catalytique (S). Les quatre brins d'ADN sont clivés (a), échangés grâce à la rotation de  $180^\circ$  d'un demi-site (b) et reliés (c). Figure tirée de Hallet et Sherratt (1997).

parfaitement avec Cre, Flp et XerC/D, contient les résidus actifs (Kwon *et al.*, 1997; Jessop *et al.*, 2000; Sarkar *et al.*, 2001).

L'alignement de 105 recombinaisons de cette famille a permis d'identifier la présence de plusieurs résidus hydrophobes situés principalement dans la partie N-terminale, formant le centre de la structure globulaire des protéines. De plus, cette même étude a permis de trouver trois régions (patches) conservées chez les lambda-intégrases. La première est située dans la partie N-terminale du premier domaine et possède le motif LT-EEV--LL (EcXerD-L113 à L122) qui forme une protubérance à la surface de la protéine. La seconde, située entre les feuillets  $\beta 2$  et  $\beta 3$ , comprend une lysine flanquée soit par deux sérines et/ou thréonines ( $\lambda$ Int-S234; K235; T236), soit par deux glycines et/ou méthionines (EcXerD-G171; K172; G173), formant un côté de la poche catalytique. La troisième est une partie (cluster) riche en phénylalanines précédée par des résidus acides et suivie par des résidus polaires ( $[(D,E)-[F,Y,W,V,L,I,A]_{3-6}[S,T])$  qui, localisée entre les hélices  $\alpha D$  et  $\alpha E$  (EcXerD-I206 à S212), agit comme stabilisateur de la structure (Nunes-Düby *et al.*, 1998).

### 1.2.2. CLIVAGE EN CIS ET EN TRANS

La tyrosine catalytique peut cliver l'ADN soit en *cis* ou en *trans*. Quand le lien phosphodiester clivé est adjacent au protomère, le mode de clivage est dit en *cis* alors que lorsqu'il a lieu à l'autre extrémité de la région d'espace ou sur le brin opposé, il est dit en *trans* (Figure 3). En règle générale, les lambda-intégrases d'origine bactérienne clivent en *cis* malgré quelques expériences où  $\lambda$ Int et Cre



**Figure 3 :** Clivage en *cis* et en *trans*. L'attaque nucléophile de la tyrosine catalytique (Y) d'une recombinaise sur le lien phosphodiester activé (P, rond blanc) peut survenir de quatre façons différentes. Le clivage peut provenir par le protomère adjacent (*cis*), par le protomère à l'autre extrémité de la région d'espace (*trans horizontal*) ou par un protomère du brin opposé (*trans vertical* ou *diagonal*). Figure tirée de Blakely et Sherratt (1996a).

permettent le clivage en *trans* (Han *et al.*, 1993; Shaikh et Sadowski, 1997). Cependant, les recombinases d'origine eucaryotes clivent plutôt en *trans* (Lee *et al.*, 1999).

Cette différence provient d'une divergence dans la séquence des enzymes, la distance entre la tyrosine nucléophile et la poche catalytique est plus grande chez les enzymes eucaryotes que chez les procaryotes. En effet, l'alignement du motif II de plusieurs recombinases montre que le résidu conservé, mais non invariable, glycine est situé de neuf à dix aa en amont de la tyrosine catalytique chez les recombinases bactérienne alors qu'ils sont séparés par 14 à 17 aa chez les eucaryotes. Cette augmentation dans l'espacement se reflète dans la structure tertiaire de la protéine, la tyrosine pouvant ainsi agir en *trans* (Blakely et Sherratt, 1996). Le clivage de l'ADN par la recombinase Flp lors d'une réaction complète est bimodale. En effet, l'échange du brin supérieur est *trans* horizontal alors que la résolution de la jonction d'Holliday se fait par une réaction *trans* diagonal. Le passage entre les deux formes de clivage demanderait l'activation du partenaire par isomérisation de la jonction d'Holliday, comme dans le cas du système Xer (Lee *et al.*, 1998 et section 5.2.).

Des études de protéines chimériques Cre-Flp ont montré que les deux domaines participent à la reconnaissance du site de liaison à l'ADN mais que c'est la partie C-terminale qui détermine le mode de clivage (Shaikh et Sadowski, 2000). Cependant, dans les deux types de clivage, celui-ci a lieu au même endroit entre le site de liaison de la protéine possédant le motif RHR et le premier nucléotide de la région centrale (Tribble *et al.*, 2000).

## 2. LA RECOMBINAISON À SPÉCIFICITÉ DE SITE DE TYPE XER

### 2.1. GÉNÉRALITÉS

Lors de la réplication du matériel génétique, les fourches de réplifications peuvent être arrêtées par des bris simple ou double brins, résultants de la rencontre de certains obstacles, qui doivent être réparés par recombinaison selon la voie RecFOR ou RecBCD respectivement (Cox *et al.*, 2000). Cependant, un nombre impair de réactions de recombinaison homologue forme des dimères chromosomiques ou plasmidiques dans environ 15% des cellules normales en croissance exponentielle, engendrant ainsi une mauvaise séparation entre les cellules-filles lors de la division cellulaire (Steiner et Kuempel, 1998b).

La recombinaison de type Xer permet la monomérisation des dimères chromosomiques et plasmidiques. Cette recombinaison, qui est RecA-indépendante, agit sur de courtes séquences spécifiques de 28 à 30 pb constituées de deux bras quasi-palindromiques de 11 pb, sites de liaison des recombinases, flanquant une région centrale de six à huit pb où a lieu l'échange des brins. Deux recombinases, XerC et XerD, sont utilisées pour médier, à l'aide de facteurs accessoires, l'échange des brins et ainsi assurer une réaction complète. Lorsque les bactéries sont mutantes pour le(s) gène(s) *xerC*, *xerD*, *ftsK* ou pour le site *dif*, il y a apparition du phénotype Dif, caractérisé par la formation de longs filaments avec des cellules anuclées, induction du système SOS et la mort cellulaire (Kuempel *et al.*, 1991).

## 2.2. XERC ET XERD

Les deux recombinases impliquées dans la réaction de recombinaison de type Xer possèdent 37% d'identité entre elles (Blakely *et al*, 1993). Celles-ci possèdent une activité structurale et mécanique semblable aux topoisomérases de type IB des eucaryotes (Sherratt et Wigley, 1998; Cao et Hayes, 1999).

### 2.2.1. DES GÈNES CONSERVÉS

Des recherches dans les bases de données comprenant la séquence chromosomique de 16 eubactéries et cinq archéobactéries ont permis de trouver des homologues à XerC et XerD chez un grand nombre de bactéries possédant un chromosome circulaire (Recchia et Sherratt, 1999; Tableau I). Cette analyse a permis de trouver deux recombinases chez la majorité des espèces. Cependant, des bactéries peuvent posséder soit une, deux ou trois recombinases, ce qui permet de croire que les recombinases de type Xer proviennent d'une duplication génique d'une protéine ancestrale et qu'ils auraient été transmis dans les séparations subséquentes. Le fait de posséder deux recombinases confère deux avantages: l'assurance d'un alignement adéquat des sites d'action, ce qui élimine l'étape du test après le premier échange (contrairement à Cre) et le contrôle du clivage et de l'échange des deux brins (Recchia et Sherratt, 1999; Sciochetti *et al.*, 2001). Il est intéressant de noter que les bactéries ne possédant pas d'homologues à Xer sont aussi déficientes dans les gènes de recombinaison homologue (*M. genitalium*, *M. pneumoniae*) ou possèdent un génome linéaire (*B. burgdorferi*). De plus, presque toutes les bactéries qui possèdent des homologues

Organisme	Nombre de gènes <i>xer</i>	Présence d'homologue à FtsK
<b>Eubactéries</b>		
<i>Escherichia coli</i>	2	+
<i>Bacillus subtilis</i>	2	+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2	+
<i>Haemophilus influenzae</i>	2	+
<i>Helicobacter pylori</i> J99	3	+
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	2	+
<i>Treponema pallidum</i>	2	+
<i>Thermogota maritima</i>	1	-
<i>Mycoplasma genitalium</i>	0	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	0	-
<i>Borrelia burgdorferi</i>	0	+
<b>Archéobactéries</b>		
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	1	-
<i>Aeropyrum pernix</i>	1	-
<i>Methanococcus jannaschii</i>	0	-

**Tableau I :** Présence de gènes homologues aux recombinases de type Xer et à FtsK chez différentes espèces d'Eubactéries et d'Archéobactéries. Tiré de Recchia et Sherratt (1999).

aux recombinaisons Xer ont aussi un gène qui ressemble à FtsK. Ces deux observations démontrent les relations étroites du système Xer avec la recombinaison homologue et la division cellulaire.

De plus, la séquence de ces gènes est assez conservée car, en utilisant des sondes construites à l'aide des gènes *xerC* et *xerD* de *E. coli*, la présence de ceux-ci a été observée par des études d'hybridation de type Southern chez plusieurs espèces d'*Enterobacteriaceae* (Sirois et Szatmari, 1995).

### 2.2.2. ACTIVITÉ CATALYTIQUE ET TOPOISOMÉRIQUE

Chez les recombinaisons XerC/D le domaine N-terminal (résidus 1 à 107) permet la liaison à l'ADN alors que le domaine C-terminal (résidus 108 à 298) permet, grâce à des interactions avec la (les) protéine(s) partenaire(s), la formation du complexe synaptique et le bon positionnement de la tyrosine catalytique (Spiers et Sherratt, 1999). Les deux recombinaisons agissent ensemble pour mener à bien la réaction complète mais sont catalytiquement autonomes. En effet, la présence du partenaire est obligatoire pour médier l'échange de leur brin mais l'activité nucléophile de celui-ci n'est pas requise, ce qui permet de déduire l'importance de la structure du complexe de recombinaison (Arciszewska et Sherratt, 1995; Arciszewska *et al.*, 1997).

Les recombinaisons à spécificité de site de type Xer, comme tous les membres des lambda-intégrases, possèdent la tétrade catalytique en C-terminal. Les résidus RHR forment une poche catalytique qui active le lien phosphodiester afin de permettre le clivage de l'ADN par le résidu tyrosine. De plus, ce résidu

catalytique est caché, ce qui suggère une conformation inactive en absence du partenaire et/ou de l'ADN. Chez ces recombinases, un autre acide aminé est conservé en plus de la tétrade RHRV. En effet, un résidu lysine (EcXerD-K172), situé entre les feuillets  $\beta 2$  et  $\beta 3$  dans le motif III, entre en contact avec le substrat et joue un rôle important lors de la réaction de recombinaison. Cette lysine est aussi conservée chez les topoisomérases eucaryotes de type IB (qui elles possèdent une tétrade catalytique RKRY), ce qui laisse présager que ces deux familles proviennent d'une transférase ancestrale commune. De plus, le domaine C-terminal de la topoisomérase I du virus de la vaccine a une structure similaire au domaine catalytique de Cre et d'autres intégrases (Cao et Hayes, 1998; Cheng *et al.*, 1998). Il a déjà été montré que les intégrases possèdent une activité topoisomérasique de type I permettant de relaxer les plasmides surenroulés. Cependant, cette activité des recombinases est inhibée par la présence (même si catalytiquement inactive) de l'autre recombinase (Cornet *et al.*, 1997).

### 2.3. XERC

Le gène *xerC* (numéro d'accèsion de GenBank : U00096) est situé à la 85<sup>ème</sup> minute du chromosome de *Escherichia coli* K12 (3 993,9 kb), soit près de l'origine de réplication, et code pour une protéine de 298 aa avec un poids moléculaire de 33,8 kDa (Colloms *et al.*, 1990). Le gène est le troisième dans une unité de transcription polycistronique contenant *dapF*, qui code pour la diaminopimelate épimérase, un enzyme impliqué dans la biosynthèse de la lysine et du peptidoglycane, ainsi que deux cadres de lecture ouvert (*orf235* et *orf238*).

Il est aussi intéressant de noter que le gène suivant est l'hélicase II *uvrD*, impliquée dans la réponse SOS (Colloms *et al.*, 1990). Chez les bactéries Gram-positives *Bacillus subtilis* et *Lactobacillus leichmanii*, le gène *xerC* est dans le même opéron que les protéines de choc thermique. (Becker et Brendel, 1996). Comme tous les membres de la famille des  $\lambda$ -intégrases, la protéine possède les résidus conservés R148 dans le motif I ainsi que H240, R243, Y275 dans le motif II (Colloms *et al.*, 1990; Abremski et Hoess, 1992).

La protéine XerC se lie au bras gauche de 11 pb des sites de recombinaison, tant plasmidiques que chromosomiques (Blakely *et al.*, 1993). Lors de la réaction de recombinaison, XerC se lie plus faiblement au site d'action où elle agit en premier en clivant le brin supérieur, formant ainsi une jonction d'Holliday (McCulloch *et al.*, 1994b). Celle-ci, qui sera ensuite résolue par XerD, adopte une conformation différente selon la structure de XerC. En effet, des expériences avec XerC de *Haemophilus influenzae* montrent que celle-ci forme une jonction d'Holliday pouvant être résolue par EcXerD *in vitro* alors que la jonction d'Holliday formée par EcXerC ne peut pas être résolue (Neilson *et al.*, 1999). L'arginine conservée en position 148 est importante pour la structure du complexe XerC-ADN. En effet, quand elle est mutée, la structure de la jonction Holliday est changée pour une conformation permettant le clivage par XerD tout en inhibant le clivage par XerC. Cette propriété s'appelle le phénotype SPIS pour Stimulation of Partner, Impairment of Self (Arciszewska *et al.*, 2000).

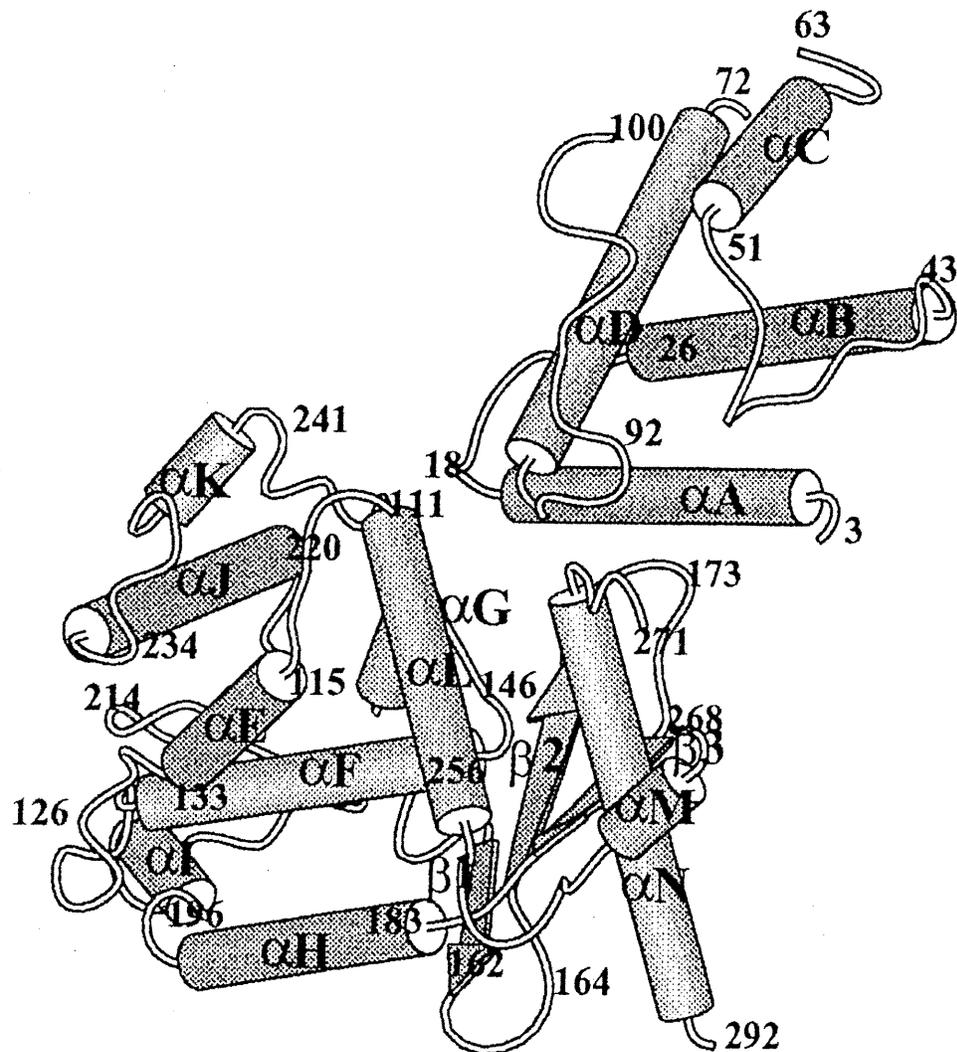
## 2.4. XERD

La seconde recombinase impliquée dans la recombinaison de type Xer est XerD. Le gène est situé à la 63<sup>ème</sup> minute du chromosome de *E. coli* K12 (3 036,9 kb) et était nommé *xprB* jusqu'à tout récemment (numéro d'accèsion de GenBank : U00096) (Blakely *et al.*, 1993). Le gène est le premier d'une unité multicistronique comprenant *xerD*, *dsbC*, une oxydo-réductase périplasmique et l'exonucléase *recJ* (Lovett et Kolodner, 1991).

XerD se lie au bras droit des sites de recombinaison et sa liaison entraîne une courbure de l'ADN de 40°, ce qui va faciliter la liaison subséquente de XerC. On remarque d'ailleurs des similarités dans la structure tertiaire entre le motif hélice-tour-hélice de la protéine CAP et la structure formée par les hélices  $\alpha$ G et  $\alpha$ J chez XerD (Blakely et Sherratt, 1996; Subramanya *et al.*, 1997).

### 2.4.1. STRUCTURE CRISTALLISÉE

La structure tridimensionnelle de XerD à 2,5 Å révèle la présence de deux domaines (Subramanya *et al.*, 1997 et Figure 4). La partie N-terminale, qui comprend les résidus 1 à 107, contient quatre hélices  $\alpha$  où les hélices  $\alpha$ A et  $\alpha$ B, parallèles entre elles, sont perpendiculaires aux deux autres hélices parallèles  $\alpha$ C et  $\alpha$ D. Le domaine C-terminal (résidus 108 à 298) est principalement composé d'hélices  $\alpha$  mais contient aussi trois feuillets  $\beta$  anti-parallèles. C'est dans cette partie que sont présents les résidus catalytiques conservés dans tous les membres de la famille des  $\lambda$ -intégrases, soit R148 situé dans le domaine I ainsi que H244, R247 et Y279 dans le domaine II.



**Figure 4 :** Structure cristallisée de XerD de *E. coli*. Les nombres représentent le début et la fin d'une structure secondaire. Figure tirée de Subramanya *et al.* (1997).

Des études de délétions ont montré que la partie N-terminale, ainsi que le domaine I possédant l'arginine, sont importants pour la liaison à l'ADN. Cependant, le deuxième domaine, même si certains résidus de celui-ci sont en contact avec l'ADN, peut être supprimé sans compromettre la capacité de liaison. Ceci permet de supporter le modèle où les recombinaisons possèdent deux domaines de liaison à l'ADN qui interagissent avec deux parties différentes de ce site (Blakely et Sherratt, 1994; Spiers et Sherratt, 1997). Les résidus 244 à 268 sont importants pour la coopérativité de liaison avec XerC et surtout les résidus 263 à 268 car ils interagissent avec l'hélice  $\alpha$ M du partenaire (Spiers et Sherratt, 1999).

### 3. LES SITES D' ACTIONS

#### 3.1. GÉNÉRALITÉS

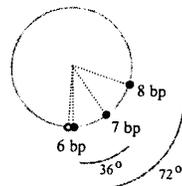
Les sites de recombinaison sont de 28 à 30 pb séparés en trois sections, deux sites de liaisons de 11 pb (Xer) ou 13 pb (Cre) pour la liaison des recombinaisons et un site d'enjambement de six à huit pb où a lieu l'échange des brins. Cette faible différence dans la région centrale se traduit par un écart plus marqué dans le positionnement le long de la double hélice. En effet, selon la projection cylindrique de l'ADN, on remarque que les liens phosphodiester activés se superposent presque parfaitement quand la région centrale est de six pb (Cre ou Xer-*dif*) alors qu'il y a un décalage de  $36^\circ$  pour sept pb ( $\lambda$ Int) ou de  $72^\circ$  pour huit pb (Flp ou Xer-*cer*) (Grainge et Jayaram, 1999 et Tableau II). Chez les sites de recombinaison de type Xer, on constate que le bras droit, site de liaison de XerD, est beaucoup plus conservé que le bras gauche. Ceci se traduit par une

	XerC	Espacement	XerD
ColA ( <i>car</i> )	GGTGCGTACAA	. . CGGATG	TTATGGTAAAT
ColE1 ( <i>cer</i> )	GGTGCGTACAA	TTAAGGGA	TTATGGTAAAT
ColE2	GGGGCGTACAA	. . CGGGAG	TTATGGTAAAT
ColE3 ( <i>cer3</i> )	GGTGCGTACAA	. . CGGGAG	TTATGGTAAAT
ColK ( <i>ckr</i> )	GGTGCGTACAA	TTAAGGGA	TTATGGTAAAT
pHS-2 ( <i>hmr</i> )	GGTGCGCGCAA	. TAAAATG	TTATGTAAAT
plasmide R1	GGTGCGCATAA	. . TGTATA	TTATGTAAAT
pNTP16 ( <i>nmr</i> )	GGTGCGCGTAA	. TGAGACG	TTATGGTAAAT
pSC101 ( <i>psi</i> )	GGTGCGCGCAA	. . GATCCA	TTATGTAAAC
<i>B. subtilis</i> ( <i>dif</i> )	ACT TCCTAGAA	. . TATATA	TTATGTAACT
<i>E. coli</i> ( <i>dif</i> )	GGTGCGCATAA	. . TGTATA	TTATGTAAAT
<i>H. influenzae</i> ( <i>hif</i> )	A TTTCGCATAA	. . TATAAA	TTATGTAAAT
<i>S. aureus</i> ( <i>dif</i> )	ACTTCCTATAA	. . TATATA	TTATGTAACT

CONSENSUS

C AA

TTATG AA



**Tableau II :** Alignement de plusieurs sites de recombinaison de type Xer plasmidiques et chromosomiques et projection cylindrique de la région d'enjambement. La séquence consensus est élaborée à partir de plusieurs autres sites connus. Tableau adapté du mémoire de Manuela Villon (Clonage et caractérisation du gène *xerD* de *Proteus mirabilis*). La figure est tirée de Grainge et Jayaram (1999).

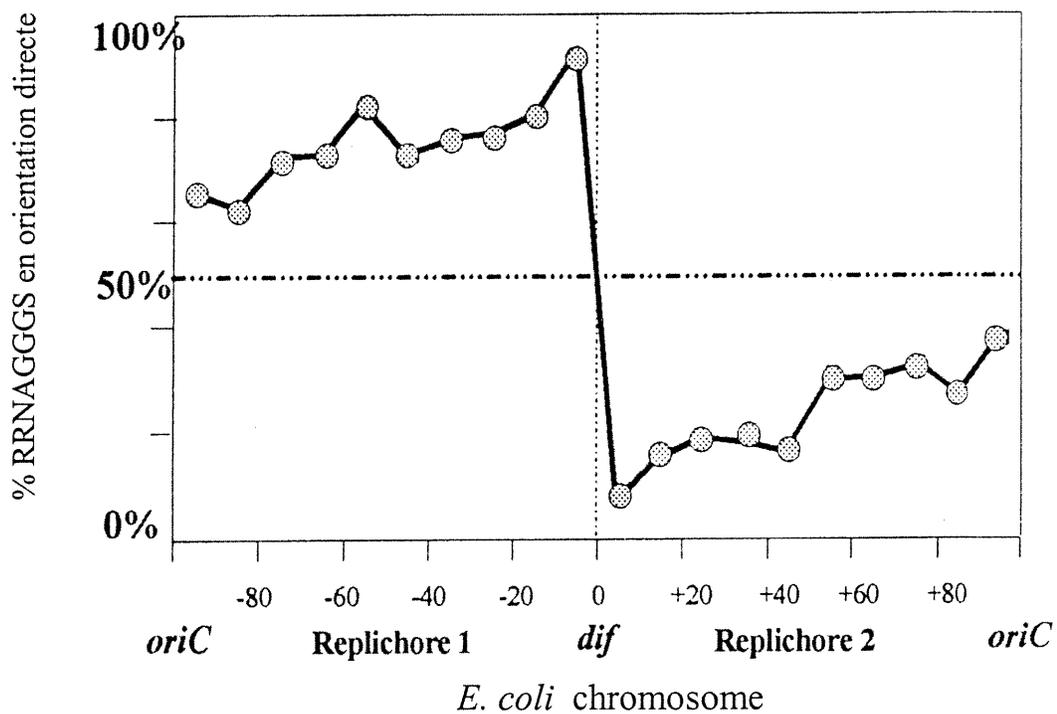
liaison plus forte de XerD que de XerC, cette dernière interagissant plus fortement avec son partenaire qu'avec l'ADN (Blakely et Sherratt, 1994; Spiers et Sherratt, 1999 et Tableau II).

### 3.2. SITE DIF

#### 3.2.1. ESCHERICHIA COLI

##### 3.2.1.1. TERMINUS DU CHROMOSOME

Chez *E. coli*, le site *dif* (**d**eletion **i**nduced **f**ilamentation) a été trouvé dans la région de terminaison de réplication du chromosome à 1 588,8 kb (à la 34,5<sup>ème</sup> minute) entre les sites d'arrêt de la réplication *TerA* et *TerC*, directement à l'opposé de l'origine de réplication (Kuempel *et al.*, 1991 et Figure 9). Le chromosome de *E. coli* est composé de courtes séquences polarisées RRNAGGGS trouvées préférentiellement sur le brin avancé, de *oriC* jusqu'à *dif* (Salzberg *et al.*, 1998; Capioux *et al.*, 2001 et Figure 5). Dans les 400 kb à proximité de *dif*, ces segments polaires sont à 90% situés sur le brin avancé jusqu'à la région où *dif* est actif, soit le DAZ pour « *dif* activity zone » de 16 kb, qui est lui-même dépourvu de sections polarisées (Cornet *et al.*, 1996; Kuempel *et al.*, 1996; Pérals *et al.*, 2000). Il a été montré que *dif* peut être transplanté n'importe où dans les 150 kb flanquant sa localisation normale en autant que les séquences polarisées convergent vers le nouveau *dif* (Pérals *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent que le DAZ est créé par ces séquences polaires ou DOPE pour **DAZ-organizing polar elements** (Capioux *et al.*, 2001). Cependant, la séquence du site chromosomique n'est pas importante car celui-ci peut être remplacé, sans l'apparition de



**Figure 5 :** La distribution du motif RRNAGGGS. La figure représente le pourcentage de segments polarisés retrouvés selon une orientation directe sur chaque bras *oriC-dif* du chromosome. Figure tirée de Capioux *et al.* (2001).

phénotype, par le site *psi* de pSC101 ou *loxP* du phage P1, ce qui montre que c'est plutôt la position au terminus et non le site en tant que tel qui est important pour la réaction de monomérisation (Cornet *et al.*, 1994; Leslie et Sherratt, 1995).

De plus, le site *dif* est un des endroits où agit préférentiellement la topoisomérase IV (Hojgaard *et al.*, 1999). Cet enzyme essentiel permet la décaténation des chromosomes à la fin de la réplication (voir section 5.1.). Ce qui pourrait simplement être une observation intéressante soulève cependant quelques questions. En effet, l'action de la topoisomérase IV à *dif* nécessite la présence de XerC et XerD. Il serait intéressant de savoir si la décaténation au site *dif* a lieu avant ou après la résolution des dimères chromosomiques. La première possibilité semble plus probable car la topoisomérase IV, qui enlève les supertours positifs, agit généralement avec la gyrase, qui introduit des supertours négatifs, ces derniers étant requis pour la recombinaison à *dif* (Colloms *et al.*, 1996). De plus, FtsK n'est pas nécessaire pour l'activité de la topoisomérase IV à ce site (Hojgaard *et al.*, 1999).

### 3.2.1.2. STRUCTURE

Ce site de 28 pb contient les deux sites de liaison de 11 pb formant une séquence quasi-palindromique, séparés par 6 pb (Kuempel *et al.*, 1991). Seulement trois nucléotides, situés à l'extrémité des bras, sont reconnus spécifiquement par la bonne recombinase (Blakely et Sherratt, 1994; Hayes et Sherratt, 1997). De plus, des expériences d'interférence chimique ont montré que XerD se lie sur les deux faces de la double hélice d'ADN (sous forme B) et

interagit avec les sillons mineurs et majeurs, ce qui permet de maintenir le contact avec l'ADN après le clivage (Blakely et Sherratt, 1994). Ces mêmes expériences montrent que XerC n'a pas besoin de contacts avec les phosphates du squelette de l'ADN. La recombinase est en contact avec le sillon majeur des deux faces de la double hélice mais ces interactions sont faibles, c'est plutôt les interactions avec XerD qui sont importantes (Blakely et Sherratt, 1994; Spiers et Sherratt, 1999).

Afin d'obtenir une ségrégation normale lors de la réaction de recombinaison, la présence de la protéine de division cellulaire FtsK au septum est essentielle.

### 3.2.2. BACILLUS SUBTILIS

Dernièrement, Sciochetti *et al.* (2001) ont trouvé le site *dif* de *B. subtilis*. Ce site, comme chez *E. coli*, a été trouvé dans la région terminale de réplication (à 1 941,8 kb), à l'opposé de l'origine de réplication et se trouve près d'un gène d'ARN<sub>t</sub>. Certaines variétés ont été trouvées dans la région centrale et dans le bras gauche, site de liaison de CodV (l'homologue à XerC chez *B. subtilis*) (Tableau II). Ces différences dans la séquence empêchent la liaison de XerC de *E. coli* à ce site mais celles-ci se reflètent par les divergences entre les protéines EcXerC et BsCodV. La région centrale est très semblable à *Ecdif*, ce qui confirme que le ratio purine:pyrimidine dans la région centrale est très important afin d'assurer un repliement adéquat de la jonction d'Holliday et permettre l'activation catalytique de la bonne paire de recombinases (Arciszewska *et al.*, 1997; Azaro et Landy, 1997; Sciochetti *et al.*, 2001). De plus, on constate que le site de liaison de RipX

(l'homologue à XerD chez *B. subtilis*) est plus conservé, et ce malgré la grande divergence évolutive entre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives (Sciochetti *et al.*, 1999; 2001).

### 3.3. SITES PLASMIDIQUES

#### 3.3.1. DISTRIBUTION DES PLASMIDES

Contrairement à ce qui était cru, de récentes expériences semblent démontrer que les plasmides à grand nombre de copies ne sont pas distribués aléatoirement dans la cellule mais sont plutôt situés à des positions fixes dans la bactéries avec des prédispositions pour certaines régions (Pogliano *et al.*, 2001). En effet, il semble que les plasmides sont répliqués au centre de la cellules pour être ensuite dirigés vers les positions 1/4 et 3/4 (Gordon et Wright, 2000). Ainsi, la formation de multimères plasmidiques cause une diminution du nombre de copies résultant en une mauvaise séparation entre les cellules-filles lors de la division cellulaire (Summers et Sherratt, 1984). De plus, les multimères ont tendance à se répliquer plus souvent que les monomères (car ils possèdent plusieurs origines de réplication) et s'accumulent ainsi plus rapidement, ce qui engendre une sous-population de cellules avec un plus grand taux de pertes plasmidiques (Summers *et al.*, 1993).

Ainsi, plusieurs plasmides possèdent un site de recombinaison afin d'assurer leur maintenance dans les bactéries. Cependant, aucun de ces sites n'a été trouvé chez les plasmides des bactéries Gram-positives où on remarque d'ailleurs une plus grande quantité de multimères plasmidiques.

### 3.3.2. SITE CER DE COLE1

Le plasmide ColE1 possède un site nommé *cer* (pour ColE1 resolution) où les recombinases XerC et XerD peuvent se lier pour mener à bien une réaction de recombinaison afin de monomériser les multimères résultants d'un nombre impair de recombinaisons homologues lors de la réplication. Le site *cer* est le doyen des sites de recombinaison de type Xer et est rapidement devenu la référence chez les sites plasmidiques (Summers et Sherratt, 1984). Ce site couvre environ 250 pb, comprenant un promoteur, une boîte ARG 100 pb à gauche de *cer* et trois sites de contact avec PepA. Ainsi, la présence de ces deux protéines accessoires est nécessaire afin d'obtenir un complexe nucléoprotéique qui va permettre seulement la recombinaison intramoléculaire pour monomériser ces plasmides. Pour la formation du complexe, les deux sites présents sur une molécule dimérique se rencontrent par glissement de un vers l'autre et non par collisions aléatoires car cela nécessiterait plusieurs fois le repliement de la double hélice et demanderait trop d'énergies (Hodgman *et al.*, 1998).

#### 3.3.2.1. RCD

Chez ColE1, et six autres plasmides multicopies, le promoteur  $P_{cer}$ , situé entre la boîte ARG et le site *cer*, code pour un ARN antisens de 95 nucléotides, Rcd, qui va empêcher la division cellulaire des bactéries possédant des multimères plasmidiques. Cette inhibition va permettre la formation du complexe synaptique, de loin l'étape la plus longue de la réaction, afin qu'il y ait résolution (Patient et Summers, 1993).

Tous ces ARN possèdent une région consensus de 15 pb située, selon la structure secondaire, dans la tige majeure de la forme en épingle et constituerait le site actif du transcrit. Cependant, aucune région chromosomique où pourrait se lier Rcd n'a été trouvée jusqu'à présent. Des expériences sont en cours pour voir si Rcd interagit plutôt directement avec une protéine (Sharpe *et al.*, 1999). D'ailleurs, le fait que les plasmides soient répliqués au centre de la cellule (donc où se situent les multimères avant d'être résolus), rend très intéressante l'hypothèse de la liaison de Rcd à une protéine du septum ou de division cellulaire.

#### 4. LES FACTEURS ACCESSOIRES

Dans les réactions de recombinaison entre deux sites, les facteurs accessoires permettent à la structure tridimensionnelle de la réaction d'adopter une conformation menant à la résolution complète des multimères. Ces facteurs accessoires sont des protéines dont le but premier n'est pas la recombinaison à spécificité de site mais dont leur activité de liaison à l'ADN est utilisée pour compléter la réaction.

Au site chromosomique *dif*, la protéine de division cellulaire FtsK joue un rôle dans la réaction. Chez le plasmide ColE1, les protéines ArgR et PepA interagissent directement avec *cer*, formant un complexe où les séquences accessoires s'enroulent d'une façon plectonémique dans une version main droite tout en capturant trois supertours négatifs (Alén *et al.*, 1997). Chez le plasmide

pSC101, c'est plutôt la présence des protéines PepA et ArcA qui est nécessaire pour la recombinaison au site *psi* (Cornet *et al.*, 1994).

#### 4.1. FtsK

Pendant longtemps, on croyait que les facteurs accessoires étaient requis seulement pour les sites plasmidiques et que la recombinaison de type Xer au chromosome était autant inter- qu'intramoléculaire. Dernièrement, il a été montré par Steiner et Kuempel (1998a) que la résolution de dimères chromosomiques était impossible chez les mutants *ftsK*<sup>-</sup>, ce qui concordait avec d'anciennes études qui montraient que le phénotype des cellules déficientes pour n'importe quelle partie de FtsK était caractérisé par la formation de filaments ainsi que par l'induction de la réponse SOS et de la protéine de stress Usp (Diez *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998).

L'immense protéine de division cellulaire de 1 330 aa FtsK possède trois domaines particuliers. La partie N-terminale de 260 aa forme un domaine comprenant plusieurs hélices  $\alpha$  transmembranaires qui localisent la protéine au septum. Cette partie est essentielle pour la division cellulaire (Draper *et al.*, 1998). La fonction de la région centrale de 556 aa riche en prolines et glutamines (qui présente la répétition consécutive du motif de dix acides aminés : PQQPV[A/P]PQ[P/Q]Q) est inconnue pour l'instant. Le domaine C-terminal de 514 aa forme la partie cytoplasmique, qui contient des séquences consensus de liaison à l'ADN, nécessaire pour une bonne partition de l'ADN dans la cellule (Yu *et al.*, 1998).

#### 4.1.1. RÔLE DANS LA RECOMBINAISON

Même si toutes les parties de FtsK doivent être présentes pour la recombinaison afin d'assurer le bon positionnement de FtsK (Boyle *et al.*, 2000), c'est la partie cytoplasmique qui agit sur la réaction (Steiner *et al.*, 1999). Étant donné que FtsK n'influence pas la formation de la jonction d'Holliday, on peut en déduire qu'il agit après la formation de celle-ci. En effet, la protéine influence la structure de la jonction d'Holliday, en agissant sur l'ADN dans une réaction indépendante de la séquence d'ADN mais dépendante d'ATP (Barre *et al.*, 2000). L'utilité de FtsK sur la jonction d'Holliday peut aussi être déduite des expériences avec la recombinase XerC de *Haemophilus influenzae*, qui peut mener à bien une réaction de recombinaison entre deux sites *dif* sans la présence de FtsK (Neilson *et al.*, 1999). De plus, en augmentant le nombre de purines sur le brin inférieur, la jonction d'Holliday adopte une conformation qui favorise l'échange par XerD et devient FtsK-indépendant (Recchia *et al.*, 1999).

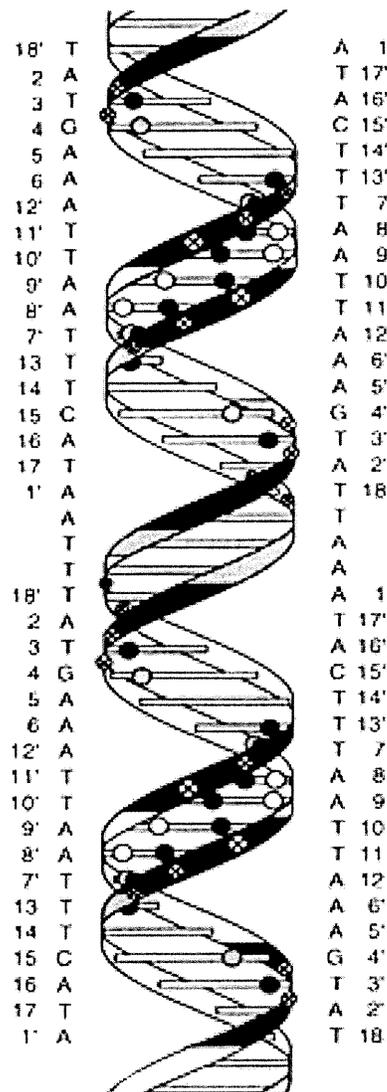
Chez *B. subtilis*, deux homologues de FtsK ont été trouvés, soit SpoIIIE, qui permet la ségrégation du matériel génétique dans la préspore et YtpT, mais aucune de ces protéines n'est essentielle pour la recombinaison à *Bsdif*. Cependant, le produit du gène *yopP*, codé par le prophage SP $\beta$  semble faciliter quelque peu la réaction de recombinaison. De plus, la protéine PrfA, qui est impliquée dans la recombinaison homologue et dans la condensation du chromosome, pourrait aider la réaction (Pedersen et Setlow, 1999; Sciochetti *et al.*, 2001).

#### 4.2. ARGR

Le répresseur de la biosynthèse de l'arginine, nommé *xerA* lors des premières expériences, joue un rôle très important dans la recombinaison aux sites *cer* (Stirling *et al.*, 1988). La protéine est composée de 156 aa et a un poids moléculaire de 16,5 kDa. La partie N-terminale (résidus 1 à 71) est basique et permet la liaison à l'ADN alors que la partie C-terminale (résidus 74 à 156), qui est acide, permet la liaison à L-arginine et l'oligomérisation. Généralement, elle se retrouve sous forme hexamérique de 100 kDa et c'est sous cette forme qu'elle se lie, d'une façon L-arginine-dépendente, à une boîte ARG située 100 pb à gauche du site *cer*.

Dans le cache, lors de sa fonction de répresseur, ArgR lie deux boîtes ARG en palindrome, séparées par une région centrale de trois pb. Chaque boîtes ARG possèdent 18 nucléotides, soit deux séquences symétriques de neuf pb (Cunin *et al.*, 1986 et Figure 6). Des expériences ont démontré que c'est l'ADN qui s'enroule autour de la protéine et non l'inverse. De plus, ArgR entre en contact avec seulement une face de la double hélice d'ADN et ne touche pas la région centrale (Tian *et al.*, 1992; Sunnerhagen *et al.*, 1997). L'hexamère couvre ainsi quatre tours de la double hélice et établit des contacts spécifiques avec une guanine (G4) et deux thymines (T3; T13') dans chaque sillons majeurs d'une face de la double hélice. Les groupements méthyles des quatre thymines permettent la reconnaissance du sillon majeur par des interactions hydrophobes et/ou de van der

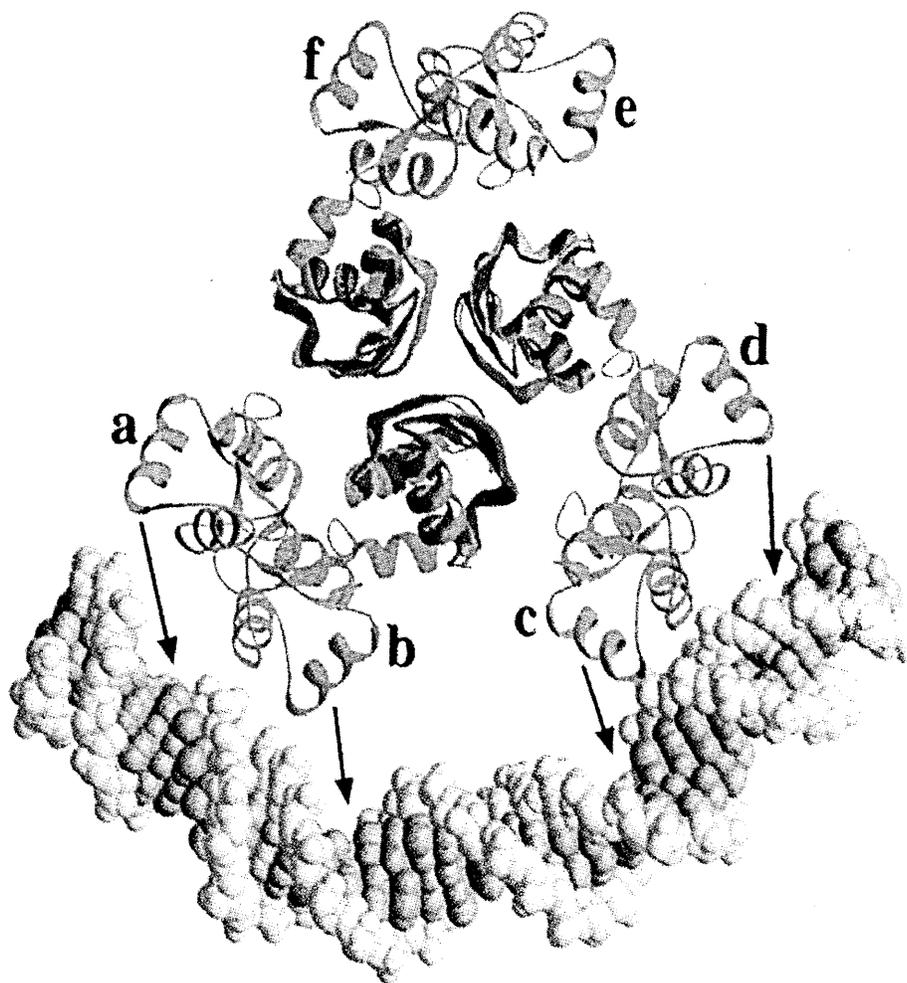
## consensus



**Figure 6 :** Représentation du site de liaison de ArgR. Les ronds marqués de croix sont les groupements phosphates qui sont en contact avec l'ADN. Les ronds noirs, gris et blancs dans la double hélice représentent les nucléotides qui établissent des liens respectivement forts, moyens et faibles avec le répresseur. Figure tirée de Wang *et al.* (1998).

Waals. De plus, le sillon mineur est aussi important pour la liaison. En effet, la protéine est en contact étroit avec quatre paires de bases A-T/T-A (A9; T10; T11; T12) sur les deux sillons mineurs externes (Wang *et al.*, 1998). Ce type de liaison s'explique par le domaine N-terminal, qui a une structure semblable aux membres de la famille des hélice-tour-hélice ailés (winged helix-turn-helix; wHTH) qui sont composés de trois hélices  $\alpha$ , dont deux selon un modèle hélice-tour-hélice, flanquées d'« ailes » composées de feuillettes  $\beta$ . Il semblerait que le contact à l'ADN se fait par la troisième hélice et les feuillettes  $\beta$  (Sunnerhagen *et al.*, 1997). Ceci a été confirmé par la structure tridimensionnelle de ArgR de *Bacillus staerothermophilus* (Ni *et al.*, 1999 et Figure 7).

Pour la recombinaison de type Xer au site *cer*, le repliement d'un plasmide dimérique va ainsi former une boîte ARG où pourra se lier ArgR (Guhathakurta et Summers, 1995) entraînant ainsi une torsion de 70° à 90° dans le plan de la double hélice, ce qui rapproche les deux sites directement répétés sur la même molécule (Tian *et al.*, 1992). Des études mutationnelles ont montré l'importance des résidus leucine (L107) et aspartates (D128; D129) dans le domaine C-terminal qui permettent l'oligomérisation, nécessaire pour former le complexe synaptique. Ces résidus permettent les interactions, par des liaisons hydrophobes, entre deux trimères de ArgR. De plus, une mutation d'un de ces acides aminés inhibe les réactions à *cer* (Burke *et al.*, 1994; Van Duyne *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997).



**Figure 7 :** Modèle de liaison à l'ADN de BstArgR. Les flèches représentent les contacts entre les hélices  $\alpha$  et le sillon majeur de l'ADN. Figure tirée de Ni *et al.* (1999).

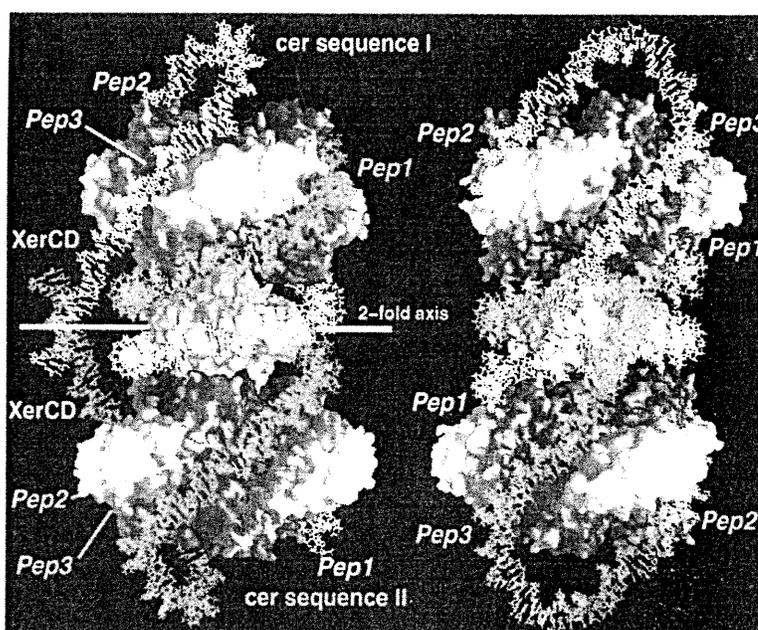
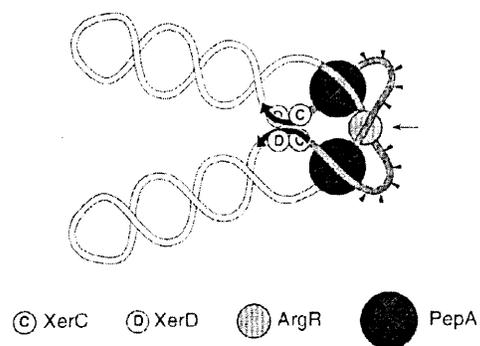
#### 4.3. PEPA

La deuxième protéine accessoire pour le plasmide ColE1, anciennement nommée *xerB*, est l'aminopeptidase A (PepA), une amino exopeptidase (Stirling *et al.*, 1989). Celle-ci est une protéine hexamérique, composée de monomères de 503 aa, d'un poids moléculaire de 55,3 kDa chacun et nécessitant du  $Mn^{2+}$  comme cofacteur. La partie N-terminale (résidus 1 à 166) permet l'activité de liaison à l'ADN et, séparée par une longue hélice  $\alpha$ , la partie C-terminale (résidus 193 à 503), qui se superpose parfaitement à la leucine aminopeptidase (LAP), contient l'activité aminopeptidasique (Burley *et al.*, 1990; Sträter *et al.*, 1999). Pour son rôle dans la recombinaison au site *cer*, c'est la capacité de liaison à l'ADN de l'hexamère (ou le dimère de trimères) et non l'activité aminopeptidasique qui est requise afin de stabiliser le complexe nucléoprotéique (McCulloch *et al.*, 1994a; Alén *et al.*, 1997).

En temps normal, les aminopeptidases de type A sont impliquées dans la dégradation des peptides générés par le clivage des protéines dans la cellule et dans le morcellement des peptides exogènes pouvant être utilisés comme nutriments (Miller et Schwartz, 1978). PepA est aussi utilisé comme un des éléments essentiels du mécanisme de régulation pyrimidine-spécifique contrôlant la transcription de l'opéron *carAB* chez *E. coli* et *S. typhimurium*. Dans ce cas, CarP (PepA) introduit, à l'aide de IHF, une courbure dans l'ADN afin de moduler l'activité du promoteur (Charlier *et al.*, 1995a; 1995b). Cet opéron consiste en les gènes *carA* et *carB* codant respectivement pour la petite et la grande sous-unité de la carbamoylphosphate synthétase (CPSase) qui catalyse la formation du

carbamoylphosphate requis pour la biosynthèse de l'arginine et des résidus pyrimidines. Comme pour la recombinaison à *cer*, ce n'est pas l'activité aminopeptidasique qui est requise mais des contacts protéine-protéine sont requis afin de stabiliser le complexe nucléoprotéique (Charlier *et al.*, 2000).

Des expériences mutationnelles ont montré que la capacité de liaison à l'ADN de PepA peut être diminuée par de simples mutations ponctuelles situées soit dans le domaine N-terminal ou à l'extrémité C-terminale de la protéine (Charlier *et al.*, 2000). De plus, des études de protection à la DNase I et de la structure de l'héxamère ont démontré que la double hélice d'ADN s'enroule autour de deux héxamères de PepA, ces derniers jouant un rôle clé dans la définition de la structure du complexe nucléoprotéique (Alén *et al.*, 1997; Sträter *et al.*, 1999). Selon le modèle (Figure 8), ArgR est pris en sandwich entre deux héxamères de PepA, tout en capturant trois supertours négatifs. Chaque sites *cer* possèdent trois sites de contact avec PepA et ce, dans l'ordre suivant : Pep1-ARG-Pep2-un tour de 60 pb-Pep3-XerC-XerD (Sträter *et al.*, 1999). Dans le complexe synaptique, les interactions entre ArgR-PepA et XerC/D-PepA sont faibles. Or, quand deux sites situés en *trans* (sur deux molécules séparées) se touchent, les interactions entre les protéines sont trop faibles pour permettre la formation d'un complexe synaptique : il y a une barrière énergétique empêchant les réactions de recombinaison inappropriées (Hodgman *et al.*, 1998).



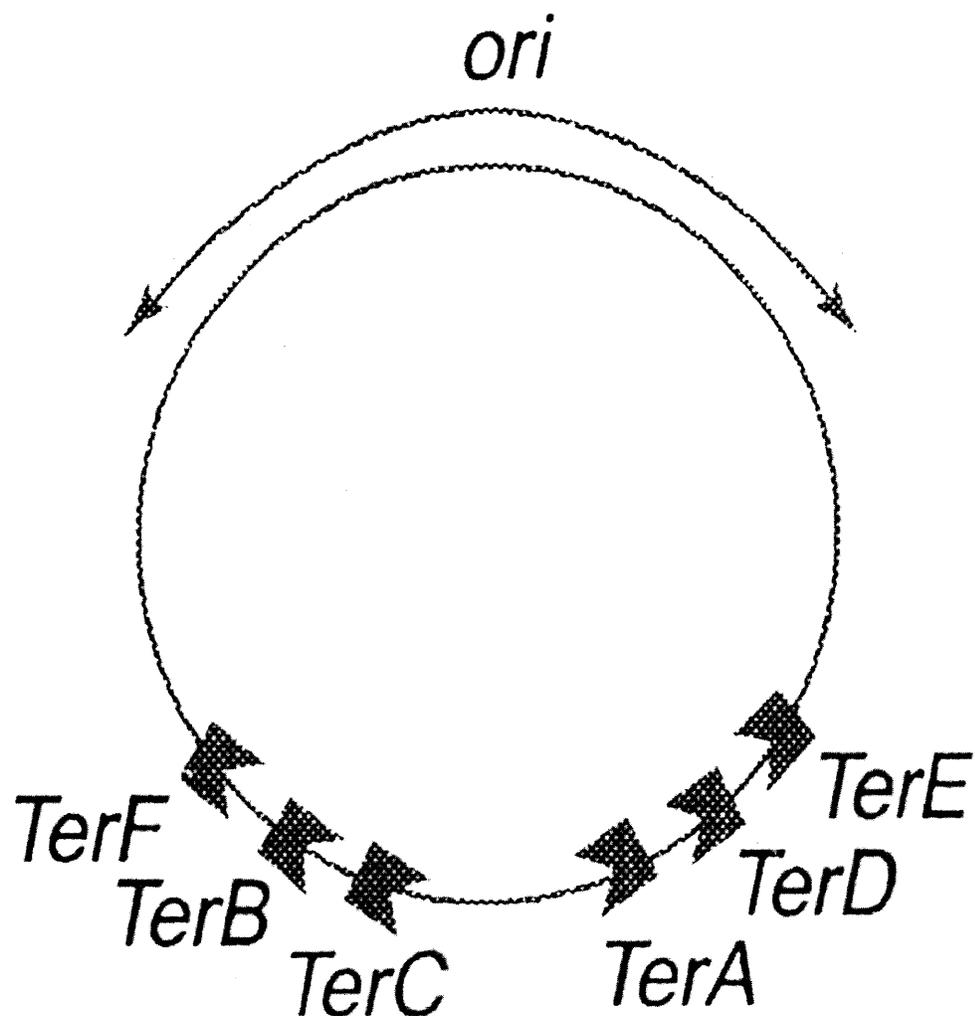
**Figure 8 :** Complexe synaptique entre deux sites *cer*. La figure du haut (A) montre l'alignement des sites et des protéines accessoires. La figure du bas (B) représente le modèle moléculaire du complexe avec les sites de contacts entre l'ADN et les protéines. Les figures sont tirées de A) Alén *et al.* (1997) et B) Sträter *et al.* (1999).

## 5. LA DIVISION CELLULAIRE

La réplication et la ségrégation du chromosome lors de la division cellulaire est un phénomène très complexe et hyper régulé qui pourrait faire l'objet d'un mémoire à lui seul. Cependant, toutes les dernières expériences démontrant un lien entre le système Xer et la division cellulaire, il vaut mieux aborder quelque peu le sujet dans ce travail (Steiner et Kuempel, 1998a; Recchia *et al.*, 1999; Hendricks *et al.*, 2000; Capiiaux *et al.*, 2001; Péralis *et al.*, 2001).

### 5.1. EN TEMPS NORMAL

À partir de l'origine de réplication (*oriC*), située à la 84<sup>ème</sup> minute du chromosome, deux fourches de réplication permettent de synthétiser les deux copies du chromosome. À l'autre extrémité du chromosome, les fourches rencontrent les sites de terminaison de réplication *Ter*, qui sont de courtes séquences de 22 pb (Figure 9). La liaison de la protéine Tus aux sites *Ter* va bloquer, d'une façon polaire, la progression des fourches de réplication. En effet, quand la polymérase arrive à cet obstacle, elle "décroche" de l'ADN, causant un bris double brin permettant l'entrée du complexe RecBCD. La synthèse de réparation et le mélange des hélices d'ADN vont former des caténanes qui seront résolus par la topoisomérase IV pour former deux chromosomes individuels qui seront ensuite séparés par surenroulement et/ou condensation (Zechiedrich et Cozzarelli, 1995). Le système Muk est très important dans cette période. En effet, la protéine MukB permet, lorsqu'en complexe avec MukE et MukF, de

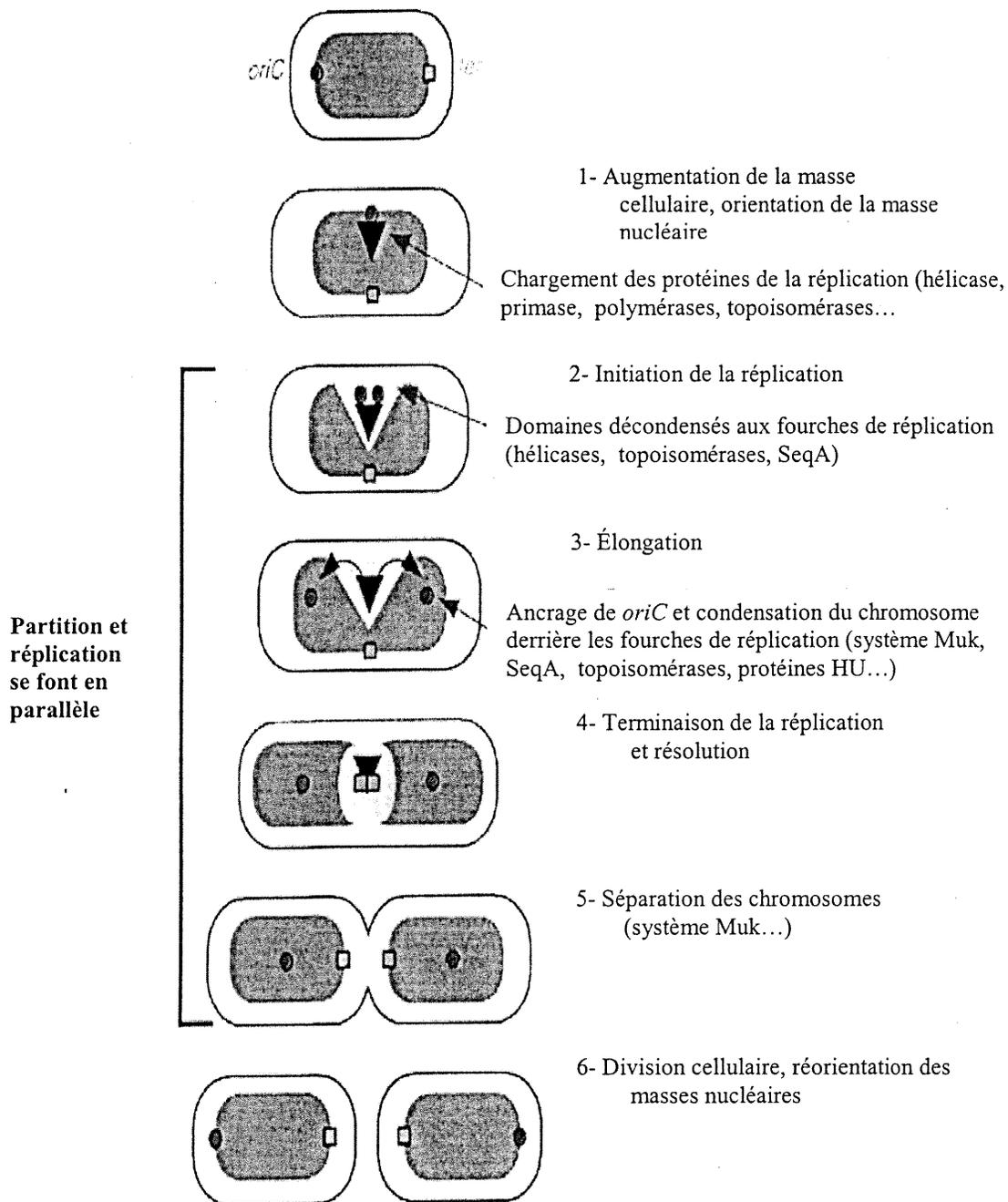


**Figure 9 :** Représentation des sites d'origine et de terminaison de réplication du chromosome. La fourche de réplication de droite est arrêtée par les sites *TerC*, *TerB* et *TerF* alors que celle de gauche est bloquée à *TerA*, *TerD* et *TerE*. Figure tirée de Michel (2000).

fournir la force tensile nécessaire à la condensation et la partition des chromosomes (Yamazoe *et al.*, 1999). Des expériences ont montré qu'une mutation dans ces gènes, qui cause une décondensation du chromosome et résultant en l'émergence de cellules sans chromosomes, peut être supprimée par une mutation dans le gène *topA* (codant pour la topoisomérase I), ce qui augmente le nombre de supertours négatifs dans l'ADN, laissant ainsi présager l'importance de la condensation du chromosome pour la ségrégation de celui-ci (Sawitzke et Austin, 2000). De plus, la protéine SeqA, qui est présente à environ 1 000 copies par cellules, se lie à l'ADN semi-méthylé derrière la fourche de réplication afin que celui-ci ait le bon degré de condensation et ainsi le protéger contre le repliement causé par la topoisomérase I. Quand l'ADN synthétisé est méthylé, le complexe ADN-SeqA se dissocie, permettant ainsi la condensation par MukB, probablement aidé par les protéines HU (Jaffé *et al.*, 1997; Nordström et Dasgupta, 2001 et Figure 10).

Les chromosomes nouvellement synthétisés sont tirés vers les pôles de la cellule, possiblement par les séquences DOPE, laissant ainsi l'origine de réplication au pôle alors que le terminus est situé près du septum. Avant le début d'un nouveau cycle de réplication (période B), les deux domaines se localisent au centre de la cellule (Niki *et al.*, 2000).

Simultanément à la réplication du chromosome, il y a augmentation de la taille de la cellule. Quand celle-ci atteint le double de sa longueur habituelle, environ au même moment que la terminaison de réplication, certains facteurs de la division cellulaire vont activer l'assemblage du «Z-ring», composé



**Figure 10 :** Modèle de la ségrégation du chromosome. Les cercles et les carrés représentent respectivement l'origine et la terminaison de la réplication alors que les triangles représentent les protéines de la réplication. Le chromosome à l'état condensé est foncé et pâle à l'état décondensé. Figure tirée de Dasgupta *et al.* (2000).

majoritairement par la protéine GTPase FtsZ, au centre de la cellule, soit sur les portions où il n'y a pas de masse nucléaire condensée (Yu et Margolin, 1999).

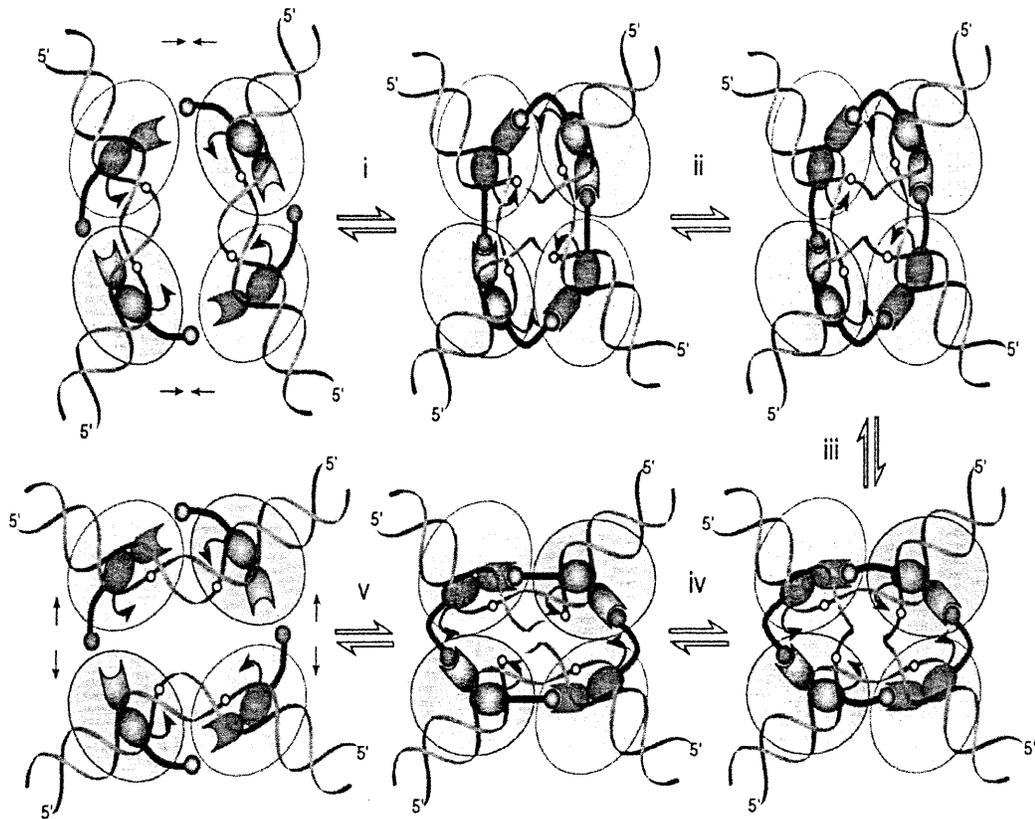
Même si le mécanisme qui permet la synchronisation entre l'assemblage du «Z-ring» et la division cellulaire n'est pas encore bien compris, plusieurs expériences se concentrent sur le système Min qui agit sur la topologie du «Z-ring». Ce système est composé de trois protéines : MinC, un inhibiteur de division cellulaire qui empêche la polymérisation de FtsZ; MinD, une ATPase se liant à MinC pour l'activer et le concentrer près de son site d'action; ainsi que MinE, responsable de l'oscillation du complexe MinC/D entre chaque extrémité de la cellule. En effet, des études de ces protéines couplées à la GFP ont montré que le complexe MinC/D se situe à la membrane. MinE forme un anneau (E-ring) au centre de la cellule et se déplace vers un pôle, ce qui désagrège le complexe MinC/D pour se reformer dans la moitié opposée. Quand le «E-ring» arrive près du pôle, il se brise pour se reformer au centre et se déplacer vers l'extrémité opposée. Cette oscillation fait en sorte que le centre est la partie de la cellule qui est le plus souvent libre du complexe MinC/D, permettant ainsi la formation du «Z-ring» (Hale *et al.*, 2001).

## 5.2. DIMÈRES CHROMOSOMIQUES

Tel qu'expliqué précédemment, lorsque deux sites *dif* sont directement répétés sur la même molécule, les séquences polaires situées de chaque côtés du site vont s'assurer que les *dif* soient situés au septum, et ce dans une bonne orientation un par rapport à l'autre, afin de permettre l'activation du complexe

XerC/D/dif/FtsK et éventuellement tirer les monomères loin du septum (Pérals *et al.*, 2001). La recombinase XerD se lie en premier au bras droit du site d'action, ce qui entraîne un changement dans la structure de l'ADN et ainsi facilite la liaison coopérative de XerC au bras gauche. Dès sa liaison (Figure 11), des interactions avec XerD permettent à cette dernière, par l'activité de sa tyrosine catalytique, d'attaquer en *cis* entre son site de liaison et le premier nucléotide de la région centrale (Arciszewska et Sherratt, 1995). L'extrémité 5'OH de trois nucléotides ainsi libérée va aller rejoindre le bout 3'PO<sub>4</sub> du brin opposé où la tyrosine de XerC permet la religation en *cis* (Grainge et Sherratt, 1999). Cette réaction va former la jonction d'Holliday, structure tridimensionnelle à quatre extrémités qui constitue l'intermédiaire obligatoire de la recombinaison spécifique de site.

À ce moment, le mécanisme exact étant pour l'instant inconnu, FtsK agit sur la structure de la jonction d'Holliday, ce qui va modifier l'interaction de type allostérique entre la partie C-terminale de XerC (cinq derniers aa) et la partie interne (hélice  $\alpha$ M) de XerD, entraînant l'inactivation de XerC et l'activation de la fonction catalytique de XerD (Hallet *et al.*, 1999; Spiers et Sherratt, 1999). En effet, la jonction d'Holliday peut exister en deux versions différentes : quand les brins supérieurs sont croisés, les sites de clivage de XerC sont situés près l'un de l'autre (~25 Å) alors que les sites de XerD sont plus éloignés (~40 Å). Cependant, quand les brins inférieurs sont croisés, les sites de clivage de XerD sont rapprochés alors que les sites de XerC sont éloignés (Arciszewska *et al.*,



**Figure 11 :** Modèle de l'activation et de l'inhibition de l'activité catalytique des Xer. Les interactions entre les protéines sont représentées par le rond et la forme concave. Lors de la réaction de recombinaison, les interactions entre XerC et XerD (i) permettent la courbure de l'ADN et ainsi exposer le brin supérieur vers l'extérieur du complexe afin d'être clivé, ce qui (ii) forme la jonction d'Holliday où les brins supérieurs sont croisés. Ensuite, (iii) l'isomérisation de la jonction d'Holliday permet d'adopter une conformation où les brins inférieurs sont croisés, ce qui (iv) mène à l'inactivation de XerC et l'activation de XerD. Finalement, (v) le complexe est résolu. Figure tirée de Hallet *et al.* (1999).

1997). Ceci est en accord avec le modèle d'isomérisation de la jonction d'Holliday où une protéine agit comme une « hélicase passive » pour permettre la mobilité de la jonction (Lee *et al.*, 1998), ce qui est supporté par la structure de Cre lié à l'ADN (Guo *et al.*, 1997; 1999; Gopaul *et al.*, 1998). Cette isomérisation de la jonction d'Holliday, telle qu'illustrée par Ortiz-Lombardia *et al.* (1999), implique un réarrangement des forces de van der Waals, des ponts hydrogènes et des interactions aux points d'embranchements.

Suite à ce changement de conformation et à l'activation de XerD, celle-ci, par l'activité catalytique de sa tyrosine, vient attaquer le brin inférieur, en *cis*, entre son site de liaison et le premier nucléotide de la région d'enjambement (Blakely *et al.*, 1997). Cette réaction libère une extrémité 5'OH qui va ensuite attaquer l'extrémité 3'PO<sub>4</sub> du brin opposé où la tyrosine de XerD permet la religation en *cis*, formant ainsi deux molécules monomériques. Ce modèle permet de dire que les deux paires de brins échangées entre les sites de recombinaison sont séparés dans le temps et dans l'espace, avec la jonction d'Holliday liée aux recombinases pouvant avoir deux conformations possibles (Arciszewska *et al.*, 2000).

### 5.3. MUTANTS DE RÉOLUTION

Chez les cellules mutantes *xerC*, *xerD*, *dif* ou *ftsK*, les dimères chromosomiques ne peuvent pas être résolus et l'ADN sera cruellement guillotiné par le septum (Hendricks *et al.*, 2000). Ceci va générer un bris double brin permettant l'entrée du complexe RecBCD qui va dégrader l'ADN.

Cependant, cette dégradation devient tragique lorsqu'elle arrive à l'opéron *hipBA*, à 77 pb de *dif*. En effet, HipA est une protéine toxique pour la cellule mais qui est inactive lorsque couplée à HipB (Black *et al.*, 1994). Cependant, lors de la dégradation de l'ADN, le gène *hipB* est souvent détruit (35%), ce qui «libère» HipA, terminant ainsi l'élongation du filament (Hendricks *et al.*, 2000).

Le phénotype Dif peut être atténué par une mutation dans le gène *recD*. Celui-ci code pour la sous-unité qui hydrolyse le brin 5' dans le complexe RecBCD jusqu'à la rencontre des sites  $\chi$  où le complexe permet la recombinaison de réparation. Cependant, quand RecD est muté, le complexe agit comme s'il était situé sur un site  $\chi$ , il n'y a donc pas de dégradation de l'ADN et le bris du chromosome causé par l'action de guillotinage peut être réparé (Kuzminov, 1999; Prikryl *et al.*, 2001). Donc, chez les doubles mutants *xerC recD*, les filaments sont formés de deux cellules côte-à-côte, ce qui signifie qu'il y a eu guillotinage lors de la division cellulaire précédente, induction de la réponse SOS et de l'inhibiteur de division cellulaire SfiA. Après 60 minutes, la division cellulaire recommence normalement, ce qui indique que l'ADN a été réparé et que l'activité de SfiA a diminué (Prikryl *et al.*, 2001).

## 6. LES BACTÉRIES LACTIQUES

Le groupe des bactéries lactiques contient plusieurs espèces, principalement des bâtonnets Gram-positifs, non-sporulants, immobiles, se situant au seuil de l'anaérobiose et de l'aérobiose. Les genres les plus connus étant les *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*.

Ces bactéries partagent la caractéristique de fermenter les sucres en produisant surtout et en grande quantité de l'acide lactique (Lacasse, 1995). Celles-ci sont très utiles dans l'industrie alimentaire car elles sont employées pour la fabrication non seulement des produits laitiers mais aussi dans la fermentation des viandes et des légumes à cause de leur contribution au développement des saveurs et leur potentiel de préservation des aliments. Cependant, la diminution du pH causé par la croissance de ces bactéries rend ces aliments un milieu idéal pour la croissance des fungi opportunistes. Ces bactéries possèdent donc des gènes codant pour des bactéricines et des antifongiques, pouvant se trouver soit sur des plasmides (principalement pour des bactéricines) ou sur le chromosome (généralement les antifongiques) (résumé dans Batish *et al.*, 1997; Sablon *et al.*, 2000).

#### 6.1. LACTOBACILLUS CASEII

Les espèces du genre *Lactobacillus sp.* se divisent en trois groupes soit : homofermentatif obligatoire, hétérofermentatif facultatif et hétérofermentatif obligatoire (Martineau, 1996). Chez ces bactéries, il y a un grand nombre de plasmides de tailles différentes (de 1,2 à 150 kb). Les plasmides sont très importants car ils peuvent même être utilisés pour la profiliation des espèces (Tannock *et al.*, 1990) mais peuvent aussi facilement être perdus, surtout à des températures de croissance subléthales (Wang et Lee, 1997). De plus, les *Lactobacillus* deviennent de plus en plus utilisés et, avec l'avènement des OGM,

la génétique de ces bactéries est en constante évolution (résumé dans Vogel et Ehrmann, 1996).

*Lactobacillus caseii* est principalement utilisé pour la fermentation des jus de légumes (carotte ou chou) et le Yakult (lait fermenté par *L. caseii* Shirota). *L. caseii*, qui est un hétérofermentatif facultatif, utilise, pour la fermentation du lactose, un système qui permet la translocation et la phosphorylation du sucre en une seule étape, ce qui est le mécanisme bioénergétique le plus efficace (seulement *L. lactis*, *L. caseii* et *Streptococcus mutans* utilisent celui-ci).

Cependant, plusieurs gènes importants pour la fermentation du lactose (pDR101), la production d'exopolysaccharides, qui permettent d'améliorer la texture de produits tels que le yogourt (*L. caseii* NCIB4114 et *L. caseii* CG11), la résistance aux antibiotiques (pAZ20, Ap<sup>R</sup>, Cm<sup>R</sup>) et la résistance aux bactériophages sont portés par des plasmides (Wang et Lee, 1997). Un des problèmes dans l'industrie laitière est justement la perte des plasmides et de cette information primordiale. La perte des plasmides semble être causée par une multimérisation des plasmides car ceux-ci ne possèdent pas de système adéquat de résolution.

## 7. Projet de maîtrise

Dans l'industrie laitière, la contamination d'un produit par des bactériophages ou des champignons cause une grande perte de temps et d'argent. Étant donné que les gènes de résistance, et d'autres gènes importants, sont portés par les plasmides, il serait intéressant d'augmenter la propagation de ceux-ci. La

présence de nombreux multimères plasmidiques chez ces bactéries explique cette mauvaise transmission de l'information. Nous pouvons présumer que si ces gènes étaient situés sur le chromosome, ils seraient systématiquement transférés dans toutes les cellules-filles. Cependant, nous devons d'abord nous assurer de l'efficacité du système Xer chez ces bactéries.

La présence de ce système chez *Lactobacillus casei* a déjà été montré par Shona Teijeiro, une ancienne étudiante au laboratoire. Lors de mon projet de maîtrise, j'ai voulu caractériser la recombinase XerD de cette espèce afin de s'assurer qu'elle peut bel et bien résoudre les dimères chromosomiques et ainsi permettre la ségrégation adéquate du chromosome. Pour ce faire j'ai complété, à partir d'une séquence de 300 nt à la fin du gène, le séquençage afin de surexprimer et purifier la protéine. Pour bien caractériser la recombinase, j'ai effectué des tests de liaison à l'ADN au site chromosomique et de relaxation de plasmides surenroulés. Par ces expériences, j'ai démontré que LcXerD se lie aux sites chromosomiques *dif* de *E. coli* et *B. subtilis*. De plus, la liaison est coopérative avec EcXerC à *Ecdif* mais pas à *Bsdif*. Cependant, il n'y a pas eu d'activité topoisomérasique sur un plasmide contenant deux sites *Ecdif* directement répétés. L'étude a permis d'écrire un article scientifique soumis à la revue MGG Molecular Genetics and Genomics, le manuscrit est présenté au chapitre suivant.

## Chapitre 2

### Article

Cloning and characterisation of *Lactobacillus casei* *xerD* gene

Keywords: site-specific recombination, Xer, tyrosine recombinase

Jean-Frédéric Flandin and George Szatmari\*

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

Address for correspondence:

C.P. 6128 Succ. Centre-Ville, Montréal, Qc, Canada, H3C 3J7

Phone: +1 (514) 343-5767

Fax: +1 (514) 343-5701

E-mail: [George.Szatmari@umontreal.ca](mailto:George.Szatmari@umontreal.ca)

Abbreviations: aa, amino acids; BSA, bovine serum albumin; bp, base pair(s); cm, centimetre; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylene diamine tetraacetate; g, gram; h, hour; IPTG, isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside; Kb, kilobase; kDa, kiloDalton; L, litres; min, minute(s); LB, Luria-Bertani; MBP, maltose binding protein; MRS, De Man, Rogosa, Sharpe; nt, nucleotide; s, second(s); SDS, sodium dodecyl sulfate; TBE, tris-borate-EDTA buffer; U, unit(s); UV, ultraviolet; V, Volt(s)

## ABSTRACT

The Xer site-specific recombination system is used by most bacteria to assure a proper segregation of their chromosome and plasmids by converting multimers into monomers. This system acts on a 28-30 bp DNA sequence, located either at the terminus of the chromosome or on multicopy plasmids. In order to resolve these multimers, two related recombinases, XerC and XerD, which are members of the  $\lambda$ -integrase family of tyrosine site-specific recombinases are implicated in this mechanism and some accessory proteins are necessary to obtain a complete reaction. For the *E. coli* chromosomal *dif* site, the division protein FtsK must be located at the constricting septum so that the Holliday junction intermediate can be resolved by XerD. On plasmid ColE1 however, it is the presence of ArgR and PepA that permits the nucleoprotein complex to adopt a conformation that allows intramolecular recombination events. The presence of XerC and XerD homologues have been shown by Southern hybridisation and by genome database searches in a variety of Gram negative and Gram positive bacteria. In this paper, we report the cloning and characterisation of the *xerD* gene of the lactic acid bacteria *Lactobacillus caseii*. This gene encodes a 293 aa protein that shows a good similarity with XerD proteins from other bacteria. This protein can specifically bind to the chromosomal *dif* site of *E. coli* and *B. subtilis* either alone or in co-operativity with *E. coli* XerC.

## 1. INTRODUCTION

Homologous recombination between sister chromosomes allow stalled or broken replication forks to reform and re-initiate replication (reviewed in Cox, 1998). However, an odd number of homologous recombination events in about 15% of growing wild-type bacteria results in the formation of a chromosome dimer (Steiner and Kuempel, 1998). Strains unable to resolve dimer chromosomes show a *dif* phenotype characterised by a decreased growth rate which results in the formation of filaments, subsequent induction of the SOS system and cell death (Kuempel et al., 1991). In *Escherichia coli*, the resolution of dimeric circular replicons is assured by the RecA-independent Xer-mediated site-specific recombination that comprises two related recombinases, XerC and XerD, members of the lambda integrase family of recombinases (Blakely et al., 1993). This mechanism is important for bacteria since proteins homologous to Xer proteins have been found in a variety of Gram negative and Gram positive bacteria by Southern hybridization (Sirois and Szatmari, 1995) or genome database searches (Recchia and Sherratt, 1999a) and some of them have been characterised (Becker and Brendel, 1996; Villion and Szatmari, 1998; Sciochetti et al., 1999).

These proteins bind co-operatively to core recombination sites that consist in two recombinase-binding sequences of 11 bp forming an imperfect palindrome separated by a 6-8 bp central region where each recombinase catalyses the exchange of one pair of strands (Blakely and Sherratt, 1994). The recombination site *dif* lies intergenically at the terminus region of the chromosome of *E. coli* and

*B. subtilis* (Kuempel et al., 1991; Sciocchetti et al., 2001) and a variety of multicopy plasmids bear a related site (*cer* in ColE1, *psi* in pSC101, etc...) (Summers and Sherratt, 1984; Cornet et al., 1994). The *dif* site lies in a 16 kb region: the “*dif* activity zone” (DAZ) at the convergence of multiple, oppositely polarized DNA sequences which permit the localisation of the *dif* site at the cell septum (Pérals et al., 2000). Furthermore, the presence of the division protein FtsK at the invaginating septum is mandatory because it changes the Holliday junction intermediate towards a conformation that allows the reciprocal activation of XerD and inactivation of XerC in order to cleave the bottom strand and thus complete the reaction (Recchia et al., 1999b; Barre et al., 2000). In *B. subtilis*, the FtsK homologues SpoIIIE and YtpT are not required but the SP $\beta$ -bacteriophage encoded gene product of *yopP* appears to have some facilitative role during chromosome partitioning (Sciocchetti et al., 2001).

In multicopy plasmids, the formation of plasmid multimers and the consequent reduction in copy number can lead to plasmid-free cells (Summers and Sherratt, 1984; Summers et al., 1993). For the resolution and monomerisation of plasmid multimers, in addition to XerC and XerD, accessory proteins are required so that the synapsis of the sites can adopt a conformation that favours intramolecular instead of intermolecular recombination. (Summers and Sherratt, 1988; Hodgman et al., 1998). For ColE1, the accessory proteins are the repressor of the biosynthesis of arginine (ArgR) (Stirling et al., 1988) and the aminopeptidase A (PepA) (Stirling et al., 1989). The first accessory protein is able to bind two halves ARG boxes, each located approximately 100 bp to the left

of the XerC binding site of their respective *cer* site and bend the DNA helix axis by 70°-90° (Tian et al., 1992). The second protein stabilises the synapsis and permits the recombination reaction between two directly repeated sites (Sträter et al., 1999; Hodgman et al., 1998). However, no *cer*-like recombination sites have been found in Gram-positive bacteria. Multicopy plasmids are found in many Gram-positive species, and to date, very little is known about the stable inheritance of these plasmids. In *Lactobacillus*, the plasmids bear important genes responsible for the fermentation of lactose or phage resistance. In this study, we described the cloning and characterisation of the XerD protein of *Lactobacillus caseii*. By studying the effect of XerD on the *dif* site, we can see if this system can assure a good segregation of the chromosome for, ultimately, insert these genes of interest in the chromosome in order to assure a better repartition in newly-form cells.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. BACTERIAL STRAINS AND PLASMIDS

The *E. coli* strains used in this study are derivatives of DS941, a *recF lacI<sup>Q</sup> lacZ ΔM15* derivative of AB1157 (Summers and Sherratt, 1988). DS9029 is DS941 *xerD::Tp<sup>R</sup> xerC::miniMu* PR13 (Colloms et al., 1996) and DS9008 is DS941 *xerD2::Tn10-9* (Blakely et al., 1993). For overexpression of His-Tag proteins, strain *E. coli* BL21 (Novagen) containing pREP4 (QIAGEN) was used and *E. coli* DH5α was used for routine plasmid transformations. The

*Lactobacillus casei* (UM 49-72) and the *Bacillus subtilis* (UM 5-69) strains used in this study are wild-type strains from the university collection.

pJF4 contains the *xerD* gene of *Lactobacillus casei* in the *Sma*I site of pUC19 and pJF13 is the pJF4 *Hind*III-*Kpn*I fragment cloned in pQE31 (QIAGEN). pRM130 is a pUC19 derivative containing the *E. coli xerD* gene (Blakely et al., 1993). pGB500 was used for overexpression of the *E. coli xerC* gene (Arciszewska and Sherratt, 1995). pSDC124 was used for topoisomerase studies and is a pUC18 derivative containing two directly repeated *dif* sites flanking a kanamycin resistance gene (Blakely et al., 1991).

## 2.2. GROWTH CONDITIONS AND DNA MANIPULATIONS

Bacteria were grown in LB broth (DIFCO) or plated on LB agar containing the appropriate antibiotics when required. *Lactobacillus casei* was grown in *Lactobacilli* MRS broth (DIFCO). Ampicillin was used at 100 µg/mL, kanamycin at 50 µg/mL and tetracycline at 6.25 µg/mL. Restriction enzymes were obtained from New England Biolabs (NEB) and used according to the supplier's conditions. All routine DNA manipulations were performed as described in Ausubel et al. (1987) and Sambrook et al. (1989). DNA fragments were extracted from agarose gels using the QIAEXII gel extraction kit or the QIAquick gel extraction kit (QIAGEN) according to manufacturer's conditions.

### 2.3. PCR CONDITIONS

PCR reactions were carried out using a CyclePro Thermocycler (Bio-Can) with either Taq DNA polymerase (QIAGEN) or Vent<sup>TM</sup> DNA polymerase (NEB) according to the supplier's conditions. Genomic PCR cycle sequencing was performed using PCR GeneAmp 2400 (Perkin-Elmer) under these conditions: 95°C/30 s, 55°C/20 s and 60°C/4 min for 100 cycles. Reactions were carried in 40 µL with 4 µg of *L. caseii* genomic DNA, 30 pmol of the following primers: XDF-INV-3 (5'CCAATCGCAATCCGACAACCTCCG) and XDR-INV-3 (5'CGGGTGGTTCCAGGAGTTACTGGGG) and BigDye<sup>TM</sup> Terminator (Perkin Elmer) according to the manufacturer's conditions. The amplified product was ethanol precipitated and sequenced using an ABI 373 autosequencer.

For the amplification of the *xerD* gene of *L. caseii*, cycling conditions were 95°C/30 s, 42°C/40 s and 72°C/1 min for 32 cycles with a final extension of 5 min at 72°C in 50 µL reactions with 2U of Vent<sup>TM</sup> polymerase and 100 pmol of the following primers: Lc-XerD-5' (5'CCATCTCTAGMAGAGCATAG) and Lc-XerD-3' (5'CTCCAGACCCTCTATCAT). The product was cloned into the *Sma*I site of pUC19 to create pJF4.

For the sequencing reactions of plasmid templates, cycling conditions were 96°C/10 s, 50°C/5 s and 60°C/ 4 min for 25 cycles with a final extension of 5 min at 60°C in a PCR geneAmp 2400 (Perkin Elmer). Reactions were in 20 µL with 250 ng of pJF4, 5 pmol of the pUC universal primers: M13F-40 (5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC) and M13R-48 (5'AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA) and BigDye<sup>TM</sup> Terminator (Perkin

Elmer) according to manufacturer's conditions. The amplified product was ethanol precipitated and sequenced using an ABI 373 autosequencer. The *xerD* sequence was submitted to GenBank (accession number: AF413208).

#### 2.4. PROTEIN OVEREXPRESSION

pJF13 and pRM130 were used to transform *E. coli* BL21 containing pREP4 and pGB500 was used to transform *E. coli* DS9029. For the expression, 2 mL of an overnight culture were used to inoculate 150 mL LB medium with the appropriate antibiotics. Cells were incubated at 37°C until an OD<sub>600</sub> of 0.6-0.7 and then induced with 0.2mM IPTG for 3 h. Cells were freeze-thawed, sonicated and cleared by centrifugation at 13,000Xg at 4°C for 15 min. The proteins were then purified using Ni-NTA spin kit (QIAGEN) for the His-Tag proteins or passed through an amylose resin column (NEB) for the MBP-tagged proteins. Proteins were separated by SDS-PAGE on 12,5% gels and visualised by Coomassie blue staining. Protein concentrations were estimated by the Bradford method using the Bio-Rad Protein assay (Bio-Rad).

#### 2.5. DNA-BINDING ASSAY

Specific DNA binding was determined by a gel retardation assay (Blakely et al., 1993) using specific fragments labelled with digoxigenin by PCR using the following primers: difF22 (5'CAGAAAAGCACTTCGCATCAC) and difR4 (5'CAATCATGACCGCCAACGAC) under these conditions: 95°C/20 s, 58°C/30 s and 72°C/30 s for 40 cycles on *E. coli* DH5α chromosomal DNA and the *dif* site

was gel purified. For the *B. subtilis dif* site, we used the following primers: BsdifF (5'GCGCATATGGCGATATGACGCTGG) and BsdifR (5'CTGAATTGGCGATTTTCCGATTGGG) under these conditions: 95°C/20 s, 68°C/30 s and 72°C/30 s for 40 cycles and the 300 bp product was extracted from non-denaturing polyacrylamide gel according to the protocol in Ausubel et al. (1987). Reactions were carried out in a buffer containing 20mM Tris pH8.0, 2mM EDTA, 50mM NaCl and 10% glycerol with 3 ng of specific DNA and 1 µg of polyIdC (Pharmacia). The reactions were incubated for 30 min at 37°C and the protein-DNA complexes were separated by non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (Ausubel et al., 1987) at 4°C in TBE buffer at 7.5 V/cm. After electrophoresis, the gels were blotted on a positively charged nylon membrane (genescreen plus, NEN<sup>TM</sup> Life Science Products), UV crosslinked and detected using the DIG detection protocol for chemiluminescence (Roche). Final detection was done with CDP-Star (NEB) followed by exposure to Kodak X-OMAT AR film.

## 2.6. IN VITRO RELAXATION REACTIONS

Reactions contained 375 ng of supercoiled plasmid substrate pSDC124 in a final volume of 20 µL of relaxation buffer (50mM Tris pH7.5, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 50 µg/mL BSA and 40% glycerol). The reactions were incubated for 16 h at 37°C, treated with 10 ng of proteinase K in its buffer (10 mM Tris pH8.0, 5mM EDTA and 0.5% SDS), phenol extracted, ethanol precipitated and analysed by electrophoresis on 1% agarose gels (0.5 V/cm, 16h).

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. CLONING OF *LACTOBACILLUS CASEII XERD* GENE AND ANALYSIS OF THE SEQUENCE

From an already sequenced region in the 3' end of the gene (nucleotide 407 to 828; Teijeiro and Szatmari, unpublished), we were able, by genomic sequencing with primers XDF-INV-3 and XDR-INV-3, to obtain the sequence of the adjacent regions, nearly 500-600 nucleotide on either side. The sequence we obtained was not very precise but we were able to calculate the approximative start and end of the gene. From this sequence, we then used two new primers, Lc-XerD-5' and Lc-XerD-3', to amplify the whole gene with Vent<sup>TM</sup> DNA polymerase. The amplicon of 1 kb was cloned into the *Sma*I site of pUC19 to obtain plasmid pJF4. By using pUC universal primers M13F-40 and M13R-48, we were able to completely sequence the gene. This experience was repeated twice by using two different clones. No differences were detected in the sequences of these two clones.

The *xerD* gene of *L. caseii* encodes a 293 aa protein which displays a good degree of similarity with the *xerD* genes of many bacteria. The best homology is seen with RipX of *Bacillus subtilis*, which shows 46% identity and 66% similarity with this recombinase. We also see a good homology with other recombinases such as *Staphylococcus aureus* XerD and *E. coli* XerD (42% and 40% identity respectively). As expected, the most similar region of the proteins is the C-terminus which contains the three domains conserved in all members of the Xer family of site-specific recombinases. In this part of the protein (between residues

126 and 293), we observed 55% identity with *B. subtilis* RipX and 49% identity with *E. coli* XerD. Furthermore, the catalytic tetrad of the Xer recombinase is also present in *L. caseii* XerD with R144, H239, R242 and Y274. The two arginines and the tyrosine are required for the DNA cleavage while the histidine is mandatory for the DNA rejoining (Blakely et al., 1993; Arciszewska and Sherratt, 1995; Cao et al., 1997). There is also a strong homology in the three boxes (as identified by Cao et al., 1997), important for recombination at *dif* (motif II and III), and DNA binding (motif I).

### 3.2. DNA BINDING ACTIVITY

In order to resolve chromosome dimers, the XerD recombinase has to bind to the right arm of the *dif* site (Blakely et al., 1993). To test the DNA binding ability of *L. caseii* XerD to the *dif* site, we incubated the purified recombinase with the *dif* site of *E. coli* labelled with digoxigenin. At fig. 2a, we see that 200 ng of *L. caseii* XerD can retard the *dif* site of *E. coli*. This quantity of protein is higher than the quantity of *E. coli* XerD required to retard *dif*. With this protein, a concentration of 10 mM was sufficient to observe the formation of a DNA-protein complex while the complex is still small with 40 mM of *L. caseii* XerD. This concentration could be due to sequence divergences between the uncharacterized *L. caseii dif* site and the *E. coli dif* site.

Another interesting observation was the simultaneous formation of two *L. caseii* XerD-*E. coli dif* complexes. The faster migrating species probably represents one monomer of XerD bound to *dif* and the second species, migrating

slower and the most abundant, represents the binding of two monomers. This hypothesis is based on our observations of *E. coli* XerC and XerD binding to the *dif* site, and the relative migration of these protein-DNA complexes (Villon and Szatmari, in preparation). With *E. coli* XerD, it was shown that the *dif* sites were first saturated by one monomer of XerD before a second monomer binds to the *dif*-XerD complex (Blakely et al., 1993). Two reasons could explain the formation of the two complexes simultaneously: *L. caseii* XerD could naturally exist in a dimeric state or the complex of *dif* with one monomer of *L. caseii* is unstable. Because of no other homologues of *E. coli* XerC and XerD having been found in a dimeric state yet, the first possibility could be ruled out. Furthermore, the second possibility seems more possible since the divergence between Gram-positive and Gram-negative recombinases may affect the binding ability towards the *dif* site of another bacteria. Indeed, the binding of *B. subtilis* RipX to *E. coli* *dif* site also shows the formation of two complexes (Sciochetti et al., 1999). Furthermore, recent experiments showed that *E. coli* XerC is unable to bind the *B. subtilis* *dif* site (Sciochetti et al., 2001).

Recently, the *dif* site of *Bacillus subtilis* was found at the terminus region of the chromosome (Sciochetti et al., 2001). Because the strongest similarity of *L. caseii* XerD was with the RipX recombinase of *B. subtilis*, we tested the binding activity to *Bsdif*. At the fig. 2b, we see a good retardation of the *Bsdif* site with XerD, also, we see the formation of a single band corresponding to one monomer of XerD bound to *Bsdif*. This result confirms that *L. caseii* XerD exists as a monomer and not as a dimer and the formation of two complexes seen at the fig.

2a results from the instability of the *L. caseii* XerD monomer-*E. coli dif* complex. Furthermore, we also notice that less protein is required to see the formation of the first complex with *B. subtilis dif* then with *E. coli dif*. With this Gram-positive *dif* site, 185 ng of *L. caseii* XerD (22 nM) allows the formation of the DNA-protein complex. These results strongly show that the gene product of *L. caseii xerD* codes for a protein that can specifically bind to the chromosomal *dif* site. As a negative control, no complexes were formed with a non-specific DNA fragment of the *pepA* promoter (data not shown).

### 3.3. CO-OPERATIVE BINDING

Xer recombinases have been found to bind co-operatively to their site. XerD is the first recombinase to bind the site on the right arm which changes the conformation of the complex and then allows the binding of XerC on the left arm (Blakely and Sherratt, 1994). On fig. 3a, we see the co-operative binding of *L. caseii* XerD with *E. coli* XerC on *E. coli dif* site. We note that *L. caseii* XerD and *E. coli* XerC bind separately on *E. coli dif* site (lane 2 and 3 respectively). Furthermore, in lane 5 to 8, we see the formation of a complex that consists of the *dif* site bound by one monomer of LcXerD and one monomer of EcXerC. In each of these reactions, the quantity of XerC is constant at 500 ng but the quantity of XerD is increasing in every lane. When there is enough of XerD, the formation of a *dif*-XerC-XerD is favoured over the *dif*-XerD-XerD complex. We can also notice that the complex *dif*-XerC-XerD is formed with a smaller amount of XerD then needed to see the formation of a *dif*-XerD-XerD complex (150 ng vs. 200

ng). This result confirms that, with *E. coli dif* site, a second monomer of *L. caseii* XerD is needed to compensate the instability of the complex formed with only one monomer. Furthermore, these results clearly show that *L. caseii* XerD can bind and interact with the related recombinase from a gram negative bacteria.

We also tested the co-operative binding of *L. caseii* XerD and *E. coli* XerC on the *dif* site of *B. subtilis*. At fig. 3b, we see that *L. caseii* XerD can bind alone but *E. coli* XerC can't retard the *B. subtilis dif* site. It was already shown that *E. coli* XerC was unable to bind *Bsdif* but a very small complex representing a co-operative binding of *E. coli* XerC and XerD was detectable after a long exposure (Sciochetti et al., 2001). In our experiments, we were unable to detect a complex corresponding to a co-operative binding between *L. caseii* XerD and *E. coli* XerC. This led us to believe that the co-operative interaction between the two recombinases is not strong enough to make up for the low-affinity of *E. coli* XerC to *Bsdif*.

#### 3.4. TOPOISOMERASE ACTIVITY

Xer recombinases show a type I topoisomerase activity (Cornet et al., 1997). This activity only needs the presence of the four catalytic residues in the carboxy-terminal region of the protein. At fig. 4, we see that *E. coli* XerD can relax the supercoiled plasmid pSDC124 containing two directly repeated *dif* sites of *E. coli*. However, at the same concentration of *L. caseii* XerD proteins, no relaxation of the plasmid can be seen. We also noted that at a concentration as high as 2.5  $\mu\text{M}$ , no relaxation was visible (data not shown). This could be

explained by the low-affinity of *L. caseii* XerD with *E. coli dif* site. Furthermore, the presence of both recombinases on a site inhibits the topoisomerase activity because, as the type I topoisomerase cleaves only one strand to let the other strand to pass through the break, the presence of a second monomer, and the subsequent protein-protein interaction needed to stabilise the DNA-proteins complex leads to the attenuation of the this activity (Cornet et al., 1997). The relaxation activity would probably be seen on a plasmid containing the *dif* site of *B. subtilis*. Nevertheless, we can see the formation of a single band migrating just faster than the open circular form. This band represents a small degradation activity by the recombinase that denotes a catalytic action but not the relaxation activity per se.

#### 4. CONCLUSION

In this paper, we described the cloning and characterisation of the *xerD* gene of *Lactobacillus caseii*. This gene encodes a 33 kDa protein of 293 aa that shows a good homology with already sequenced XerD proteins of other bacteria. The RipX recombinase of *Bacillus subtilis* and XerD of *L. caseii* share 46% identity for the complete sequence and the percentage is even higher in the C-terminal regions of the proteins that possess this catalytic activity. We also noted that XerD could bind, either alone or in co-operativity with *E. coli* XerC, to the chromosomal *dif* site of *E. coli*. However, the DNA-protein complex formed with one monomer was unstable and the presence of two monomers, and a probable protein-protein interaction between them, was necessary to obtain a stable complex.

The instability was also noticed in the co-operative binding experiments. Indeed, we saw that the formation of a *Ecdif*-EcXerC-LcXerD was favoured over the *Ecdif*-LcXerD-LcXerD complex and a smaller amount of proteins were needed to see the formation of the former complex. Because this instability could be explained by the use of a Gram-negative *dif* site, we tested the DNA binding activity on the *B. subtilis dif* site. As expected, we noticed that a lower protein concentration was required to form a DNA-protein complex and one monomer of XerD could form a stable complex. However, no co-operative binding interactions were observed with EcXerC because these interactions were not strong enough to compensate for the low affinity of the latter with the Gram-positive *dif* site. These experiments demonstrated that *L. caseii* XerD could bind to the chromosomal *dif* sites.

Unfortunately, because two monomers of LcXerD are needed to obtain a stable complex on *E. coli dif* sites and the subsequent protein-protein interactions lead to the attenuation of the topoisomerase activity of the Xer recombinases, we were unable to detect the relaxation of a supercoiled plasmid containing two directly repeated *E. coli dif* sites. The relaxation activity could probably be seen on a *B. subtilis dif* sites containing plasmid.

Our experiments demonstrated that the *xerD* gene of *L. caseii* acts on chromosomal *dif* sites. To assure a better repartition of plasmid genes in newly-formed cells, it could be possible to integrate these genes in the chromosome and the Xer recombinases of *L. caseii* could let a good segregation. In order to better

characterise the recombinase, *in vitro* and *in vivo* experiments are currently under way.

## 5. REFERENCES

Arciszewska, L.K. and Sherratt, D.J., 1995. Xer site-specific recombination *in vitro*. EMBO J. 14, 2112-2120

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K., 1987-1997. Current protocols in molecular biology, Wiley, New-York

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

Becker, J. and Brendel, M., 1996. Molecular characterization of the *xerC* gene of *Lactobacillus leichmanii* encoding a site specific recombinase and two adjacent heat shock genes. Current Microbiol. 32, 232-236

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

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

Blakely, G.W. and Sherratt, D.J., 1994. Interactions of the site-specific recombinases XerC and XerD with the recombination site *dif*. *Nucl. Acid Res.* 22, 5613-5620

Cao, Y., Hallet, B., Sherratt, D.J. and Hayes, F., 1997. Structure-function correlations in the XerD site-specific recombinase revealed by pentapeptide scanning mutagenesis. *J. Mol. Biol.* 274, 39-53

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

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

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

Cox, M.M., 1999. Recombinational DNA repair in bacteria and the RecA protein. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 63, 311-366

Hodgman, T.C., Griffiths, H and Summers, D.K., 1998. Nucleoprotein architecture and ColE1 dimer resolution : a hypothesis. *Mol. Microbiol.* 29, 545-558

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

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

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

Recchia, G.D., Aroyo, M., Wolf, D., Blakely, G. and Sherratt, D.J., 1999b. FtsK-dependent and -independent pathways of Xer site-specific recombination. *EMBO J.* 18, 5724-5734

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

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

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

Sirois, S. and Szatmari, G., 1995. Detection of XerC and XerD recombinases in Gram-negative bacteria of the family *Enterobacteriaceae*. J. Bacteriol. 177, 4183-4186

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

Stirling, C.J., Szatmari, G., Stewart, G., Smith, M.C.M. and Sherratt, D.J., 1988. The arginine repressor is essential for plasmid-stabilizing site-specific recombination at the ColE1 *cer* locus. EMBO J., 7, 4389-4395

Stirling, C.J., Colloms, S.D., Collins, J.F., Szatmari, G. and Sherratt, D.J., 1989. *xerB*, an *Escherichia coli* gene required for plasmid ColE1 site-specific recombination, is identical to *pepA*, encoding aminopeptidase A, a protein with substantial similarity to bovine lens aminopeptidase. EMBO J. 8, 1623-1627

Sträter, N., Sherratt, D.J. and Colloms, S.D., 1999. X-ray structure of aminopeptidase A from *Escherichia coli* and a model for the nucleoprotein complex in Xer site-specific recombination. EMBO J. 18, 4513-4522

Summers, D.K. and Sherratt, D.J., 1984. Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability, Cell 36, 1097-1103

Summers, D.K. and Sherratt, D.J., 1988. Resolution of ColE1 dimers requires a DNA sequence implicated in the three-dimensional organization of the *cer* site. EMBO J. 3, 851-858

Summers, D.K., Beton, C.W.H. and Withers, H.L., 1993. Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis. Mol. Microbiol. 8, 1031-1038

Tian, G., Lim, D., Carey, J. and Maas, W.K., 1992. Binding of the arginine repressor of *Escherichia coli* K12 to its operator sites. J. Mol. Biol. 226, 387-397

Villion, M. and Szatmari, G., 1998. Cloning and characterisation of the *Proteus mirabilis xerD* gene. FEMS Microbiol. Lett. 164, 83-90

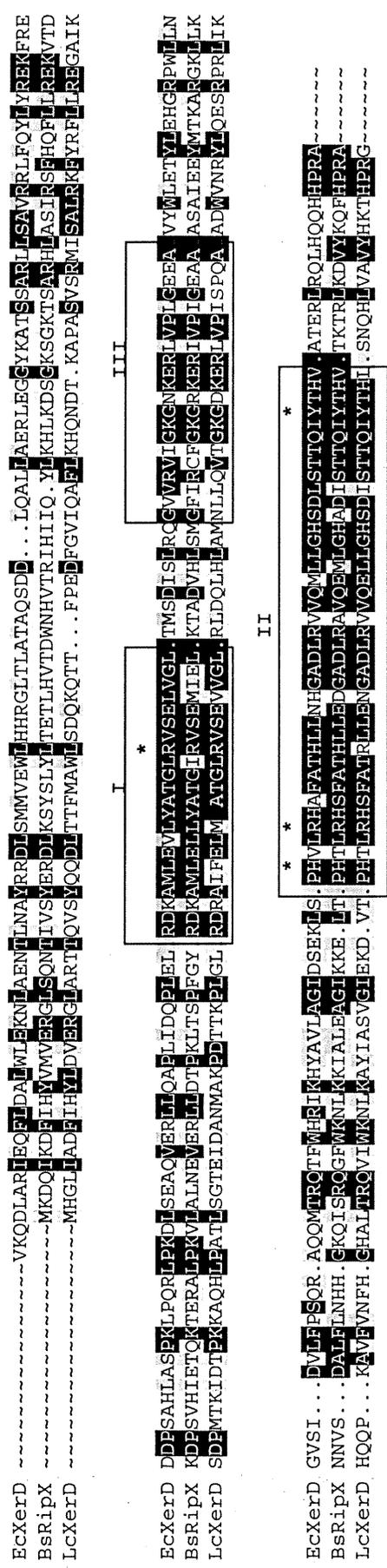


Fig. 1. Alignment of *E. coli* XerD, *B. subtilis* RipX and *L. casei* XerD proteins. Alignments were done using the Gap program from GCG. Black boxes represent identity and grey boxes represent similarity. The three conserved boxes are shown by the rectangles and the catalytic tetrad is represented by an asterisk (\*).

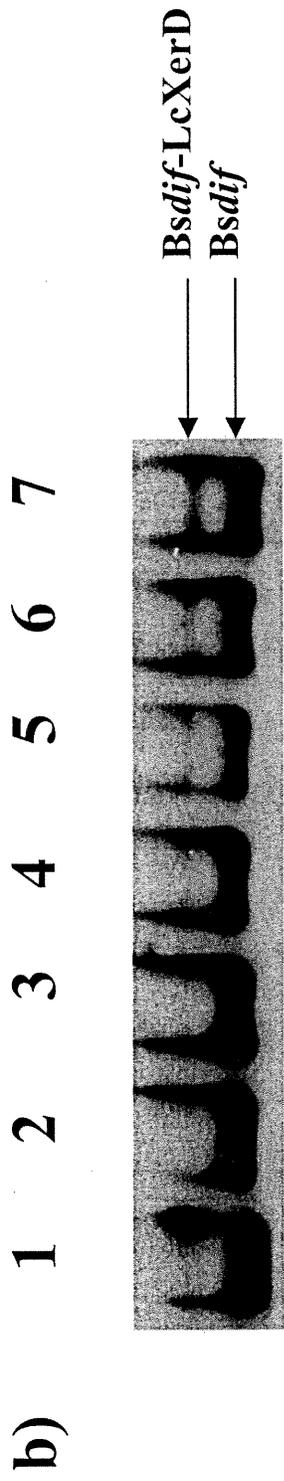
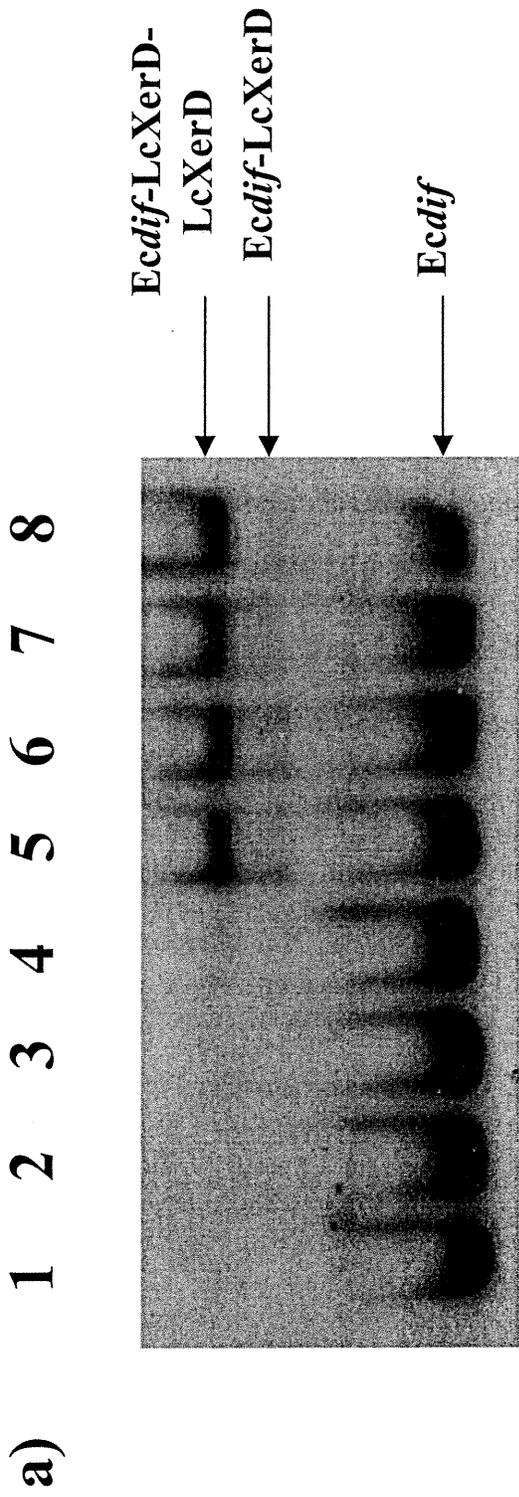


Fig. 2. DNA binding assay of *L. caseii* XerD with *E. coli dif* site (A) and *B. subtilis dif* site (B). Reactions were incubated 30 min. at 37°C and migrated through non-denaturing polyacrylamide gel with A) no proteins (lane 1), 125 ng (lane 2), 200 ng (lane 3), 250 ng (lane 4), 325 ng (lane 5), 500 ng (lane 6), 750 ng (lane 7) and 1 µg (lane 8) and B) no proteins (lane 1), 92 ng (lane 2), 185 ng (lane 3), 250 ng (lane 4), 375 ng (lane 5), 500 ng (lane 6) and 750 ng (lane 7). All the reactions contain 3 ng of digoxigenin marked *dif* fragments and 1 µg of unmarked, non-specific dIdC fragments.

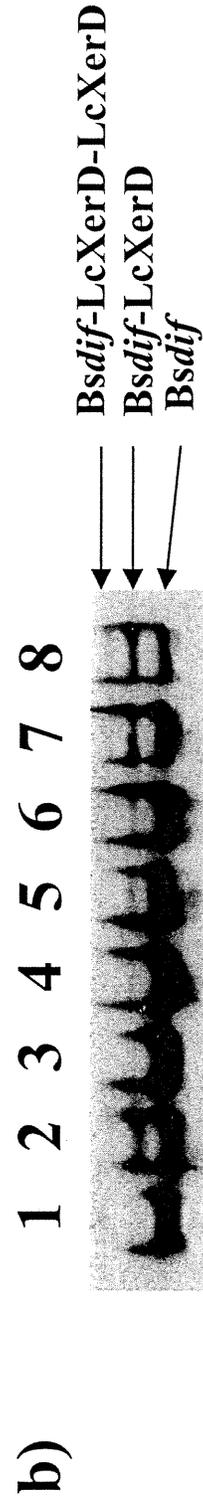
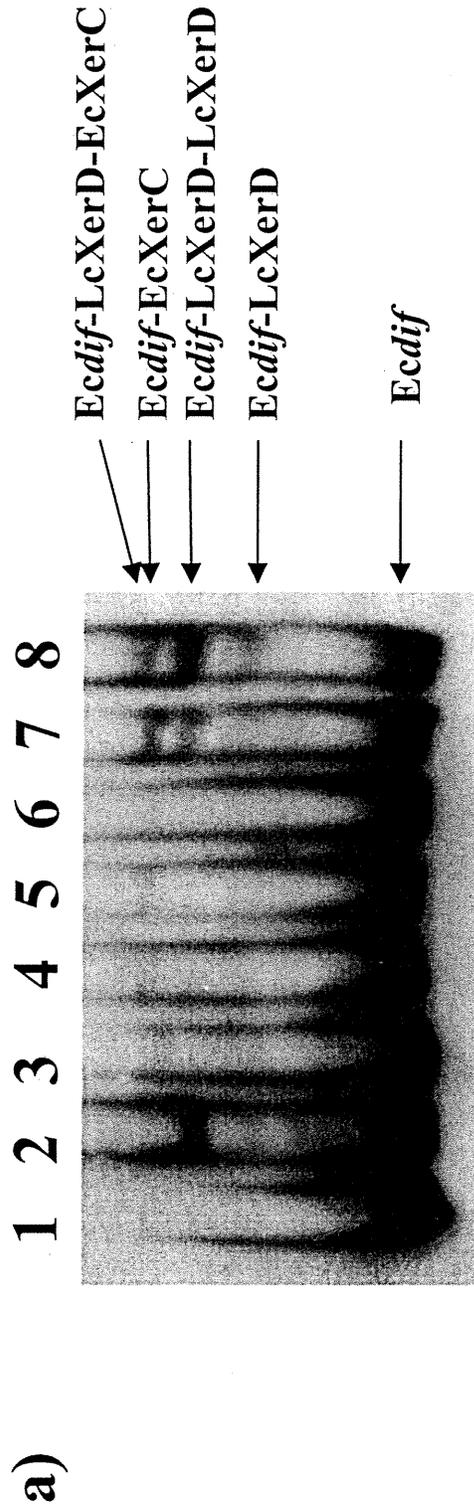


Fig. 3. Co-operative interactions between *L. caseii* XerD and *E. coli* XerC on *E. coli dif* site (A) and *B. subtilis dif* site (B). A) *E. coli dif* site is incubated with no proteins (lane 1), *L. caseii* XerD at 500 ng (lane 2), for the next reactions, *E. coli* XerC is constant at 500 ng with no XerD (lane 3), 62 ng (lane 4), 125 ng (lane 5), 250 ng (lane 6), 500 ng (lane 7) and 1  $\mu$ g (lane 8). B) *B. subtilis dif* site is incubated with no proteins (lane 1), *L. caseii* XerD at 500 ng (lane 2), for next reactions, *E. coli* XerC is constant at 1  $\mu$ g with no XerD (lane 3), 62 ng (lane 4), 125 ng (lane 5), 250 ng (lane 6), 500 ng (lane 7) and 1  $\mu$ g (lane 8). Reactions were incubated 30 min. at 37°C and migrated through non-denaturing polyacrylamide gel. All the reactions contain 3 ng of digoxigenin marked *dif* fragments and 1  $\mu$ g of unmarked, non-specific dIdC fragments.

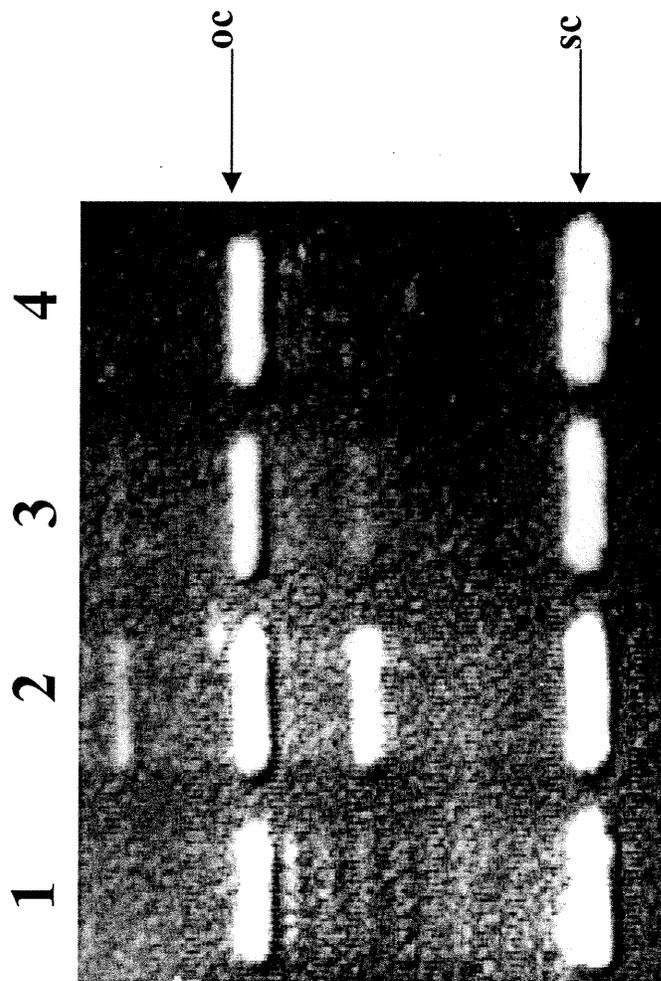


Fig 4. Topoisomerase activity of *L. caseii* XerD. Plasmid pSDC124 was incubated with no proteins (lane 4), *E. coli* XerD (lane 1) and *L. caseii* XerD at 0.125  $\mu$ M (lane 3) or 0.250  $\mu$ M (lane 2). Reactions were incubated 16 h at 37°C and analyzed on 1% agarose gels. SC means supercoiled, OC means open circular.

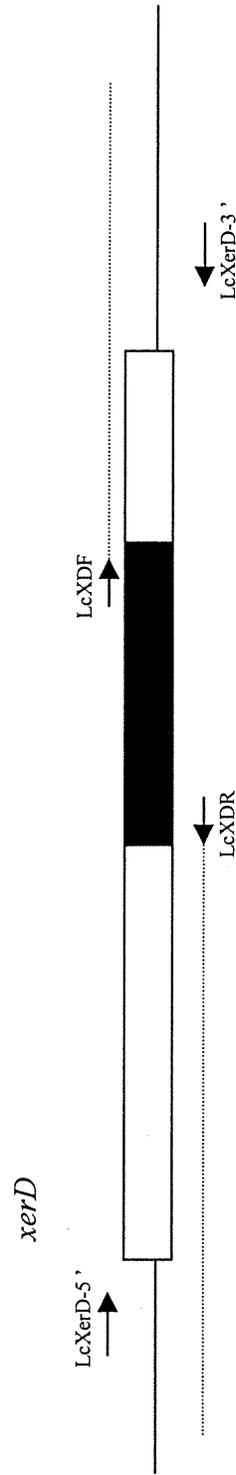
## Chapitre III

### Discussion

#### 1. LE CLONAGE DU GÈNE *XERD* DE *LACTOBACILLUS CASEII*

Une ancienne étudiante du laboratoire, Shona Teijeiro, avait, à l'aide d'amorces dégénérées, séquencé environ 400 pb dans la partie terminale (nt 407 à 828) du gène *xerD* de *L. caseii*. À partir de cette petite région, j'ai pu synthétiser de nouvelles amorces (XDF-INV-3 et XDR-INV-3) et, grâce au séquençage génomique, obtenir la séquence des sections adjacentes. Celles-ci ont permis l'amplification du gène entier à l'aide des amorces LcXerD-3' et LcXerD-5' et, ainsi, un séquençage plus fidèle (Figure 12). La séquence nucléotidique obtenue est composée à 47% de GC, ce qui semble au contenu en GC des autres gènes séquencés chez cette bactérie.

Le gène code pour une protéine de 293 aa et possède une bonne homologie avec les autres recombinases de type Xer déjà séquencées (chap II, fig 1). La meilleure concordance est obtenue avec RipX de *B. subtilis*, où on remarque 46% d'identité et 66% de similarité pour la séquence complète. La ressemblance est aussi assez bonne avec XerD (40% d'identité) et XerC (36% d'identité) de *E. coli* ainsi qu'avec CodV de *B. subtilis* (37% d'identité). Étant donné la grande divergence évolutive entre les bactéries Gram-négatives et Gram-positives, il est normal d'obtenir un plus grand pourcentage d'identité avec *B. subtilis*. Il est aussi

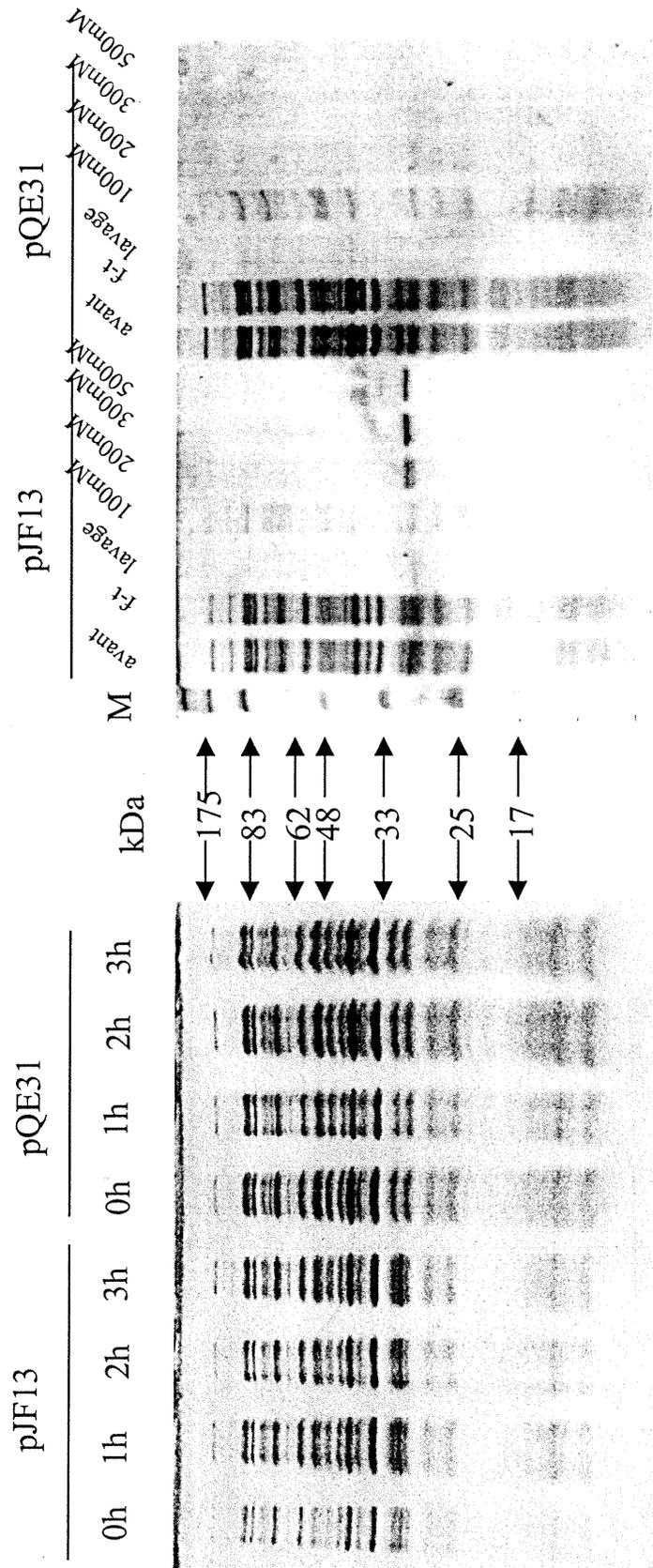


**Figure 12:** Amorces utilisées pour l'amplification du gène *xerD* de *L. casei*. La partie noire représente la section déjà séquencée. Les tirets montrent les séquences trouvées par le séquençage génomique. Les flèches indiquent la direction des amorces.

intéressant de noter qu'il y a environ 25% à 30% d'identité avec d'autres membres des  $\lambda$ -intégrases tel que FimB et FimE de *E. coli*, l'intégrase du phage S2, etc... Cependant, lors du séquençage d'autres recombinases Xer, le taux d'identité est généralement plus élevé (Becker et Brendel, 1996; Villion et Szatmari, 1998; Sciochetti *et al.*, 1999). En regardant l'arbre phylogénétique des bactéries établis à partir de l'ARNr 16S, on voit que les *Lactobacillus sp.* sont plus divergents que les espèces dont les recombinases ont été séquencées.

Comme on pouvait s'y attendre, le domaine carboxy-terminal (résidus 126 à 293) présente la meilleure homologie (55% d'identité avec BsRipX). C'est à cette extrémité que l'on retrouve les cinq acides aminés catalytiques chez les recombinases de type Xer (R144; K168; H239; R242; Y274) ainsi que les trois motifs conservés. D'ailleurs, chez LcXerD, ceux-ci possèdent 71% d'identité avec les motifs de *E. coli* et *B. subtilis*, ce qui démontre leur importance chez les recombinases.

La séquence en acides aminés laisse présager que le gène *xerD* code pour une recombinase de type Xer. Afin de mieux caractériser la protéine, le gène a été cloné dans le vecteur pQE31 (QIAGEN) pour que XerD possède une queue de six histidines en N-terminal, facilitant ainsi la purification de la protéine sans que les capacités de liaison ou de clivage de l'ADN soient affectées. Cette étape a permis de purifier une protéine de 33 kDa (Figure 13).



**Figure 13 :** Induction et purification de LcXerD. La figure de gauche représente les protéines de l'extrait cellulaire soit du vecteur seul (pQE31) ou le vecteur exprimant LcXerD (pJF13) à différents temps après l'ajout de l'IPTG. Le gel de droite montre les échantillons des différentes étapes de la purification.

## 2. LIAISON À L'ADN

La formation de dimères chromosomiques survient dans environ 15% des cellules en croissance exponentielle et peut causer des torts irréparables dans certains cas (Steiner et Kuempel, 1998b). La première étape des réactions de recombinaison menant à la résolution nécessite la liaison de XerD au bras gauche du site chromosomique *dif* (Blakely et Sherratt, 1994). Étant donné que le site *dif* de *L. caseii* a déjà été observé mais pas cloné, les expériences ont été réalisées avec le site de *E. coli* et *B. subtilis*.

Avec XerD de *E. coli* et d'autres espèces, on observe la liaison d'un monomère au site *dif* et, lorsque celui-ci est saturé, la liaison non-coopérative d'un autre monomère au complexe ADN-protéine (Blakely *et al.*, 1993; Sciochetti *et al.*, 1999). Au site de *E. coli* cependant, la liaison de LcXerD montre l'apparition simultanée de deux bandes (chap II, fig 2a): celle migrant le plus rapidement correspond à un monomère de LcXerD lié à *Ecdif* alors que celle plus retardée équivaut à deux LcXerD liés à l'ADN. Deux raisons peuvent expliquer ces résultats. Il est possible que LcXerD existe naturellement à l'état dimérique ou que l'interaction entre LcXerD et *Ecdif* est trop faible, nécessitant la présence de deux monomères pour la formation d'un complexe stable. La première possibilité semble moins attrayante car aucune recombinase n'a été trouvée naturellement à l'état dimérique. De plus, l'expérience a été réalisée sur un site d'une bactérie Gram-négative et, vu la divergence évolutive entre les Gram-positives et Gram-négatives, qui se reflète aussi dans les recombinases de type Xer, le site n'est pas optimal pour LcXerD. Ainsi, des interactions entre les protéines pourraient

permettre de compenser la faible affinité avec ce site. Il est de plus intéressant de noter que RipX de *B. subtilis* aussi forme simultanément deux complexes avec *Ecdif* (Sciochetti *et al.*, 1999).

Pour la formation d'un complexe au site *Ecdif*, 200 ng de LcXerD est nécessaire. Cette quantité est plus élevée que celle déjà notée pour les autres recombinaisons, ce qui démontre aussi la plus faible affinité avec le site de *E. coli* (40mM vs 10mM pour EcXerD). La découverte récente du site *dif* de *B. subtilis* (Sciochetti *et al.*, 2001) a fourni une autre occasion de tester l'instabilité du complexe LcXerD-*Ecdif*. En effet, au site de *B. subtilis* (chap II, fig 2b), on note qu'il y a formation d'un complexe avec un seul LcXerD, ce qui vient encore confirmer que la formation de deux complexes avec *Ecdif* résultait de l'instabilité de LcXerD pour ce site. La concentration requise pour la formation du complexe est assez élevée mais celui-ci est plus stable. De plus, il est à noter que, comme contrôle négatif, aucun complexe n'a été formé en utilisant l'ADN non-spécifique de la région promoteur du gène *pepA*.

Ces expériences démontrent assez bien que LcXerD peut se lier au site chromosomique. Cependant, vu que le site de *L. casei* ne peut être utilisé, on ne peut connaître exactement la capacité de liaison mais il est raisonnable de croire que la recombinaison se lierait assez bien à *Lcdif*. De plus, ces expériences, ainsi que celles avec *Bsdif* (Sciochetti *et al.*, 2001), démontrent que les recombinaisons Gram-positives et Gram-négatives sont assez divergentes, ce qui se traduit aussi par une différence dans les sites d'action.

### 3. LIAISON COOPÉRATIVE

La liaison au site *dif* est coopérative. En effet, la liaison de XerD entraîne une modification dans la topologie de l'ADN et, grâce aux interactions entre les deux recombinases, facilite la liaison de XerC. Cette expérience permet ainsi de mesurer les relations entre les protéines. Chez EcXerD, les résidus en position 256 à 258 et 262 à 268 permettent la liaison et l'activation de XerC (Spiers et Sherratt, 1999).

Chez *E. coli*, on voit qu'il y a formation d'un complexe avec LcXerD et EcXerC liés au site *Ecdif* (chap II, fig 3a). De plus, ce dernier complexe est formé avec moins de protéines que *Ecdif*-LcXerD-LcXerD, ce qui montre l'importance des interactions interprotéines pour la stabilité du complexe ADN-protéine(s). Ceci permet de voir que LcXerD peut se lier et interagir avec un site et une recombinase de bactérie Gram-négative.

Cependant, le complexe EcXerC-*Ecdif*-LcXerD migre légèrement plus lentement que le complexe *Ecdif*-EcXerC. En effet, EcXerC est couplé à la MBP alors que LcXerD est couplé à un His-Tag, donc ce dernier amène seulement une faible différence de poids moléculaire au complexe et ne se traduit pas par une grande divergence dans le patron de migration. Afin de s'assurer de la composition des bandes, il serait bien de faire une hybridation de type Western contre la MBP pour identifier EcXerC et contre le His-Tag pour identifier LcXerD.

Pour ce qui est de la coopérativité entre LcXerD et EcXerC au site *Bsdif*, aucun complexe avec les deux recombinases n'est formé (chap II, fig 3b). Il a

déjà été montré que EcXerC ne peut pas se lier seul à *Bsdif*. Cependant, les interactions avec EcXerD peuvent être assez fortes pour permettre la formation d'un complexe EcXerC-*Bsdif*-EcXerD (Sciochetti *et al.*, 2001). Étant donné qu'aucun complexe EcXerC-*Bsdif*-LcXerD n'a été trouvé, il est possible de croire que les interactions entre LcXerD et EcXerC sont trop faibles (seulement sept des dix acides aminés importants pour la coopérativité avec XerC sont conservés entre LcXerD et EcXerD) pour compenser la faible affinité de EcXerC pour *Bsdif*.

#### 4. ACTIVITÉ TOPOISOMÉRASIQUE

Les recombinaisons de type Xer, comme tous les membres des  $\lambda$ -intégrases, possèdent une activité de topoisomérase de type I pouvant être démontrée par la relaxation de plasmides surenroulés. Chez les recombinaisons de type Xer, seulement la présence des résidus catalytiques conservés RKHRY est requise. Cependant, la liaison du partenaire au même site d'action entraîne l'inhibition de cette activité (Cornet *et al.*, 1997). Lors de mes expériences, la capacité de relaxation de LcXerD a été mesurée à l'aide d'un plasmide comprenant deux sites *Ecdif* directement répétés.

Les résultats obtenus (chap II, fig 4) ne montrent pas de relaxation du plasmide. Ce résultat, qui peut sembler surprenant, pourrait s'expliquer par le fait que les plasmides contiennent des sites *dif* de *E. coli* et on a vu que deux LcXerD sont nécessaires pour la liaison et la formation de complexes stables à ces sites. Or, l'activité topoisomérasique est inhibée lorsque deux recombinaisons sont

présentes au site d'action. En effet, les topoisomérases de type I clivent un brin d'ADN pour permettre le passage de l'autre brin et l'ADN couplé à deux protéines est trop gros pour relaxer les supertours. On a déjà vu qu'au site *Bsdif*, seulement un monomère de LcXerD est nécessaire pour former un complexe stable avec l'ADN. On pourrait donc présumer qu'en utilisant un plasmide contenant des sites de *B. subtilis*, on pourrait observer la relaxation du plasmide. Malgré plusieurs tentatives pour obtenir ce plasmide, je n'ai pas réussi les clonages et je n'ai donc pas pu tester cette hypothèse.

## 5. AUTRES EXPÉRIENCES

En plus des expériences décrites dans l'article, j'ai commencé d'autres études afin de mieux caractériser LcXerD. En effet, j'ai commencé des tests de réactions *in vitro* et *in vivo* pour bien étudier la capacité de la recombinase de mener à terme des réactions de recombinaison.

Une des premières étapes de la recombinaison implique l'activation de la fonction catalytique de XerC par XerD grâce à des interactions entre les cinq derniers acides aminés de cette dernière avec l'hélice interne  $\alpha$ M de XerC (Hallet *et al.*, 1999). La première expérience consistait à observer la formation *in vitro* d'une jonction d'Holliday entre deux sites *Ecdif* afin de voir si LcXerD peut activer EcXerC. Cependant, les conditions de réactions n'étaient pas assez bien définies et je n'ai donc pas pu observer la formation de la jonction. D'autres expériences seraient nécessaires afin de maximiser les concentrations requises pour chaque produit. Dans ce cas, le fait que deux LcXerD se lient à *Ecdif* ne

viendrait pas empêcher la réaction car les quatre recombinases doivent être liées au site d'action pour médier l'échange des brins. Cette expérience permettra, mieux que la liaison coopérative au site *dif*, de bien caractériser les interactions entre LcXerD et EcXerC.

De plus, j'ai voulu commencer des expériences de complémentation *in vivo* avec les recombinases d'autres espèces. Pour ce faire, il faut transformer une bactérie *xerD*<sup>-</sup> (ou *ripX*<sup>-</sup> chez *B. subtilis*) avec un plasmide rapporteur (deux sites *dif* flanquant un gène facile à sélectionner tel que *lacZ* ou de résistance à un antibiotique) et un plasmide exprimant LcXerD. Dans ce cas cependant, je n'ai pas pu les compléter car le plasmide rapporteur possède la même origine de réplication que celui qui exprime LcXerD (*rep* de pMB1). Donc pour empêcher l'incompatibilité de ceux-ci, j'ai voulu changer l'origine du plasmide rapporteur pour l'origine de pACYC184 (*rep* de p15A). Cependant, les clonages réalisés jusqu'à présent n'ont pas été concluants et j'ai dû les arrêter. Cette expérience aurait permis de prouver que toutes les activités de LcXerD pouvaient se coordonner pour mener à bien une réaction complète de recombinaison.

## 6. PERSPECTIVES

Les premières expériences réalisées avec la recombinase XerD de *L. casei* nous permettent de croire qu'elle peut bien assurer une ségrégation normale du chromosome lors de la division cellulaire. Cependant, quelques expériences seraient encore utiles pour bien caractériser toutes les fonctions de l'enzyme. Les études déjà commencées sur les réactions *in vivo* et *in vitro* fourniront une

meilleure compréhension de ce système chez *L. caseii*. De plus, les études de complémentation *in vivo* avec d'autres recombinases de bactéries Gram-positives et Gram-négatives permettront de mieux mesurer les divergences entre les deux types de protéines.

Bien sûr, la caractérisation des recombinases ne peut être complète sans XerC et le site *dif*. Donc, le clonage et la caractérisation de XerC et de *Lcdif* va permettre de bien comprendre ce système chez les bactéries lactiques. De cette façon, il sera possible de voir si la recombinaison spécifique de site de type Xer permet la résolution des dimères chromosomiques et la ségrégation normale du chromosome lors de la division cellulaire. Si c'est le cas, l'intégration des gènes plasmidiques au chromosome permettra une meilleure ségrégation de ces gènes et, vu l'importance de ceux-ci, l'industrie laitière pourra maximiser ses produits.

## Bibliographie

Abremski, K.E. et R.H. Hoess (1992). Evidence for a second conserved arginine residue in the integrase family of recombination proteins. *Protein Eng.* **5** : 87-91.

Alén, C., Sherratt, D.J. et S.D. Colloms (1997). Direct interaction of aminopeptidase A with recombination site DNA in Xer site-specific recombination. *EMBO J.* **16** : 5188-5197.

Arciszewska, L.K. et D.J. Sherratt (1995). Xer site-specific recombination *in vitro*. *EMBO J.* **14** : 2112-2120.

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

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

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

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

Batish, V.K., Roy, U., Lal, R. et S. Grover (1997). Antifungal attributes of lactic acid bacteria – A review. *Crit. Rev. Biotech.* **17** : 209-225.

Becker, J. et M. Brendel (1996). Molecular characterization of the *xerC* gene of *Lactobacillus leichmanii* encoding a site-specific recombinase and two adjacent heat shock genes. *Curr. Microbiol.* **32** : 232-236.

Black, D.S., Irwin, B. et H.S. Moyed (1994). Augoregulation of *hip*, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J. Bacteriol.* **176** : 4081-4091.

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

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

Blakely, G.W. et D.J. Sherratt (1994). Interactions of the site-specific recombinases XerC and XerD with the recombination site *dif*. *Nucleic Acids Res.* **22** : 5613-5620.

Blakely, G.W. et D.J. Sherratt (1996a). *Cis* and *trans* in site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* **20** : 234-237.

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

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

Boyle, D.S., Grant, D., Draper, G.C. et W.D. Donachie (2000). All major regions of FtsK are required for resolution of chromosome dimers. *J. Bacteriol.* **182** : 4124-4127.

Burke, M., Merican, A.F. et D.J. Sherratt (1994). Mutants *Escherichia coli* arginine repressor proteins that fail to bind L-arginine, yet retain the ability to bind their normal DNA-binding sites. *Mol. Microbiol.* **13** : 609-618.

Burley, S.K., David, P.R., Taylor, A. et W.N. Lipscomb (1990). Molecular structure of leucine aminopeptidase at 2,7 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** : 6878-6882.

Cao, Y., Hallet, B., Sherratt, D.J. et F. Hayes (1997). Structure-function correlations in the XerD site-specific recombinase revealed by pentapeptide scanning mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **274** : 39-53.

Cao, Y. et F. Hayes (1999). A newly identified, essential catalytic residue in a critical secondary structure element in the integrase family of site-specific recombinases is conserved in a similar element in eucaryotic type IB topoisomerases. *J. Mol. Biol.* **289** : 517-527.

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

Charlier, D., Gigot, D., Huysveld, N., Roovers, M., Piérard, A. et N. Glansdorff (1995a). Pyrimidine regulation of the *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium carAB* operons : CarP and integration host factor (IHF) modulate the methylation status of a GATC site present in the control region. *J. Mol. Biol.* **250** : 383-391.

Charlier, D., Hassanzadeh Gh., G., Kholti, A., Gigot, D., Piérard, A. et N. Glansdorff (1995b). *carP*, involved in pyrimidine regulation of the *Escherichia coli* carbamoylphosphate synthetase operon encodes a sequence-specific DNA-binding protein identical to XerB and PepA, also required for resolution of ColE1 multimers. *J. Mol. Biol.* **250** : 392-406.

Charlier, D., Kholti, A., Huysveld, N., Gigot, D., Maes, D., Thia-Toong, T.-L. et N. Glansdorff (2000). Mutational analysis of *Escherichia coli* PepA, a multifunctional DNA-binding aminopeptidase. *J. Mol. Biol.* **302** : 411-426.

Chen, S.-H., Merican, A.F. et D.J. Sherratt (1997). DNA binding of *Escherichia coli* arginine repressor mutants altered in oligomeric state. *Mol. Microbiol.* **24** : 1143-1156.

Cheng, C., Kussie, P., Pavletich, N. et S. Shuman (1998). Conservation of structure and mechanism between eukaryotic topoisomerase I and site-specific recombinases. *Cell* **92** : 841-850.

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

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

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

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

Cornet, F., Hallet, B. et D.J. Sherratt (1997). Xer recombination in *Escherichia coli* : site-specific DNA topoisomerase activity of the XerC and XerD recombinases. *J. Biol. Chem.* **272** : 21 927-21 931.

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

Crisona, N.J., Weinberg, R.L., Peter, B.J., Sumner, D.W. et N.R. Cozzarelli (1999). The topological mechanism of phage  $\lambda$  integrase. *J. Mol. Biol.* **289** : 747-775.

Cunin, R., Glansdorff, N., Pierard, A. et V. Stalon (1986). Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol. Rev.* **50** : 314-356.

Dasgupta, S., Maisnier-Patin, S. et K. Nordström (2000). New genes with old *modus operandi* : the connection between supercoiling and partitioning of DNA in *Escherichia coli*. *EMBO reports* **1** : 323-327.

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

Dorazi, R. et S.J. Dewar (2000). The SOS promoter *dinH* is essential for *ftsK* transcription during cell division. *Microbiol.* **146** : 2891-2899.

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

Gopaul, D.N., Guo, F. et G.D. Van Duyne (1998). Structure of the Holliday junction intermediate in Cre-*loxP* site-specific recombination. *EMBO J.* **17** : 4175-4187.

Gordon, G.S. et A. Wright (2000). DNA segregation in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **54** : 681-708.

Grainge, I. et M. Jayaram (1999). The integrase family of recombinases : organization and function of the active site. *Mol. Microbiol.* **33** : 449-456.

Grainge, I. et D.J. Sherratt (1999). Xer site-specific recombination : DNA strand rejoining by recombinase XerC. *J. Biol. Chem.* **274** : 6763-6769.

Guhathakurta, A. et D. Summers (1995). Involvement of ArgR and PepA in the pairing of ColE1 dimer resolution sites. *Microbiol.* **141** : 1163-1171.

Guo, F., Gopaul, D.N. et G.D. Van Duyne (1997). Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature* **389** : 40-46.

Guo, F., Gopaul, D.N. et G.D. Van Duyne (1999). Asymmetric DNA bending in the Cre-*loxP* site-specific recombination synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** : 7143-7148.

Hale, C.A., Meinhardt, H. et P.A.J. de Boer (2001). Dynamic localization of the cell division regulator MinE in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **20** : 1563-1572.

Hallet, B. et D.J. Sherratt (1997). Transposition and site-specific recombination : adapting DNA cut-and-paste mechanisms to a variety of genetic rearrangements. FEMS Microbiol. Rev. **21** : 157-178.

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

Han, Y.W., Gumport, R.I. et J.F. Gardner (1993). Complementation of bacteriophage lambda integrase mutants : evidence for a intersubunit active site. EMBO J. **12** : 4577-4584.

Hatfull, G.F. et N.D.F. Grindley (1988). Resolvases and DNA-invertases : a family of enzymes active in site-specific recombination. In Genetic recombination. Raju Kucherlapati et Gerald R. Smith Ed. ASM Press, Washington. 357-396.

Hayes, F. et D.J. Sherratt (1997). Recombinase binding specificity at the chromosome dimer resolution site *dif* of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. **266** : 525-537.

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

Hodgman, T.C., Griffiths, H. et D.K. Summers (1998). Nucleoprotein architecture and ColE1 dimer resolution : a hypothesis. Mol. Microbiol. **29** : 545-558.

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

Jaffé, A., Vinella, D. et R. D'Ari (1997). The *Escherichia coli* histone-like protein HU affects DNA initiation, chromosome partitioning via MukB, and cell division via MinCDE. *J. Bacteriol.* **179** : 3494-3499.

Jessop, L., Bankhead, T., Wong, D. et A.M. Segall (2000). The amino terminus of bacteriophage  $\lambda$  integrase is involved in protein-protein interactions during recombination. *J. Bacteriol.* **182** : 1024-1034.

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

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

Kuzminov, A. (1999). Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage  $\lambda$ . *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63** : 751-813.

Kwon, H.J., Tirumalai, R., Landy, A. et T. Ellenberger (1997). Flexibility in DNA recombination : structure of the lambda integrase catalytic core. *Science* **276** : 126-131.

Lacasse, D. (1995). Introduction à la microbiologie alimentaire. Éd. Saint-Martin. Montréal. 702 p.

Lee, J., Voziyanov, Y., Pathania, S. et M. Jayaram (1998). Structural alterations and conformational dynamics in Holliday junctions induced by binding of a site-specific recombinase. *Mol. Cell* **1** : 483-493.

Lee, J., Grainge, I. et M. Jayaram (1999). Wild type Flp recombinase cleaves *in trans*. EMBO J. **18** : 784-791.

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

Liu, G., Draper, G.C. et W.D. Donachie (1998). FtsK is a bifunctional protein involved in cell division and chromosome localisation in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **29** : 893-903.

Lovett, S.T. et R.D. Kolodner (1991). Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *recJ* chromosomal region and construction of RecJ-overexpression plasmids. J. Bacteriol. **173** : 353-364.

Martin, M.C., Alonso, J.C., Suarez, J.E. et M.A. Alvarez (2000). Generation of food-grade recombinant lactic acid bacterium strains by site-specific recombination. Appl. Environ. Microbiol. **66** : 2599-2604.

Martineau, B. (1996). Systématique bactérienne : Guide d'identification des bactéries aérobies. Décarie Éd. Montréal. 160 p.

McCulloch, R., Burke, M.E. et D.J. Sherratt (1994a). Peptidase activity of *Escherichia coli* aminopeptidase A is not required for its role in Xer site-specific recombination. Mol. Microbiol. **12** : 241-251.

McCulloch, R., Coggins, L.W., Colloms, S.D. et D.J. Sherratt (1994b). Xer-mediated site-specific recombination at *cer* generates Holliday junctions *in vivo*. EMBO J. **13** : 1844-1855.

McKenzie, G.J., Harris, R.S., Lee, P.L. et S.M. Rosenberg (2000). The SOS response regulates adaptive mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** : 6646-6651.

Michel, B. (2000). Replication fork arrest and DNA recombination. *Trends Biol. Sci.* **25** : 173-178.

Miller, C.G. et G. Schwartz (1978). Peptidase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **135** : 603-611.

Mizuuchi, K. (1992). Polynucleotidyl transfer reactions in transpositional DNA recombination. *J. Biol. Chem.* **267** : 21273-21276.

Nash, H.A. (1996). Site-specific recombination : integration, excision, resolution, and inversion of defined DNA segments. *In Escherichia coli and Salmonella typhimurium- Cellular and molecular biology*. Second Edition. Frederick C. Neidhart, Ed. ASM Press, Washington. Vol. II : 2363-2376.

Neilson, L., Blakely, G. et D.J. Sherratt (1999). Site-specific recombination at *dif* by *Haemophilus influenzae* XerC. *Mol. Microbiol.* **31** : 915-926.

Ni, J., Sakanyan, V., Charlier, D., Glansdorff, N. et G.D. Van Duyne (1999). Structure of the arginine repressor from *Bacillus stearothermophilus*. *Nature Struc. Biol.* **6** : 427-432.

Niki, H., Yamaichi, Y. et S. Hiraga (2000). Dynamic organization of chromosomal DNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **14** : 212-223.

Nordström, K. et S. Dasgupta (2001). Partitioning of the *Escherichia coli* chromosome : superhelicity and condensation. *Biochimie* **83** : 41-48.

Nunes-Düby, S.E., Kwon, H.J., Tirumalai, R.S., Ellenberger, T. et A. Landy (1998). Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res.* **26** : 391-406.

Ortiz-Lombardia, M., González, A., Eritja, R., Aymami, J., Azorin, F. et M. Coll (1999). Crystal structure of a DNA Holliday junction. *Nature Struc. Biol.* **6** : 913-917.

Patient, M.E. et D.K. Summers (1993). ColE1 multimer formation triggers inhibition of *Escherichia coli* cell division. *Mol. Microbiol.* **9** : 1089-1095.

Pedersen, L.B. et P. Setlow (2000). Penicillin-binding protein-related factor A is required for proper chromosome segregation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **182** : 1650-1658.

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

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

Pogliano, J., Ho, T.Q., Zhong, Z. et D.R. Helinski (2001). Multicopy plasmids are clustered and localized in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** : 4486-4491.

Prikryl, J., Hendricks, E.C. et P.L. Kuempel (2001). DNA degradation in the terminus region of resolvase mutants of *Escherichia coli*, and suppression of this degradation and the Dif phenotype by *recD*. *Biochimie* **83** : 171-176.

Quardokus, E.M., Din, N. et Y.V. Brun (2001). Cell cycle and positional constraints on FtsZ localization and the initiation of cell division in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* **39** : 949-959.

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

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

Sablon, E., Contreras, B. et E. Vandamme (2000). Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria : mode of action, genetics and biosynthesis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **68** : 21-60.

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

Salzberg, S.L., Salzberg, A.J., Kerlavage, A.R. et J.-F. Tomb (1998). Scewed oligomers and origins of replication. *Gene* **217** : 57-67.

Sarkar, D., Radman-Livaja, M. et A. Landy (2001). The small DNA binding domain of  $\lambda$  integrase is a context-sensitive modulator of recombinase functions. *EMBO J.* **20** : 1203-1212.

Sawitzke, J.A. et S. Austin (2000). Suppression of chromosome segregation defects of *Escherichia coli muk* mutants by mutations in topoisomerase I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97** : 1671-1676.

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

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

Shaikh, A.C. et P.D. Sadowski (1997). The Cre recombinase cleaves the lox site *in trans*. J. Biol. Chem. **272** : 5695-5702.

Shaikh, A.C. et P.D. Sadowski (2000). Chimeras of the Flp and Cre recombinases : tests of the mode of cleavage by Flp and Cre. J. Mol. Biol. **302** : 27-48.

Sharpe, M.E., Chatwin, H.M., Macpherson, C., Withers, H.L. et D.K. Summers (1999). Analysis of the ColE1 stability determinant Rcd. Microbiol. **145** : 2135-2144.

Sherratt, D.J., Blakely, G., Burke, M., Colloms, S., Leslie, N., McCulloch, R., May, G. et J. Roberts (1993). Site-specific recombination and the partition of bacterial chromosomes. *In* The chromosome, Ed. J.S. Heslop-Harrison et R.B. Flavell, Bios Scientific Publishers Limited, Oxford, p. 25-41.

Sherratt, D.J. et D.B. Wigley (1998). Conserved themes but novel activities in recombinases and topoisomerases. Cell **93** : 149-152.

Sirois, S. et G. Szatmari (1995). Detection of XerC and XerD recombinases in Gram-negative bacteria of the family *Enterobacteriaceae*. *J. Bacteriol.* **177** : 4183-4186.

Spiers, A.J. et D.J. Sherratt (1997). Relating primary structure to function in the *Escherichia coli* XerD site-specific recombinase. *Mol. Microbiol.* **24** : 1071-1082.

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

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

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

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

Sträter, N., Sherratt, D.J. et S.D. Colloms (1999). X-ray structure of aminopeptidase A from *Escherichia coli* and a model for the nucleoprotein complex in Xer site-specific recombination. *EMBO J.* **18** : 4513-4522.

Stirling, C.J., Szatmari, G., Stewart, G., Smith, M.C.M. et D.J. Sherratt (1988). The arginine repressor is essential for plasmid-stabilizing site-specific recombination at the ColE1 *cer* locus. *EMBO J.* **7** : 4389-4395.

Stirling, C.J., Colloms, S.D., Collins, J.F., Szatmari, G. et D.J. Sherratt (1989). *xerB*, an *Escherichia coli* gene required for plasmid ColE1 site-specific recombination, is identical to *pepA*, encoding aminopeptidase A, a protein with substantial similarity to bovine lens leucine aminopeptidase. *EMBO J.* **8** : 1623-1627.

Subramanya, H.S., Arciszewska, L.K., Baker, R.A., Bird, L.E., Sherratt, D.J. et D.B. Wigley (1997). Crystal structure of the site-specific recombinase, XerD. *EMBO J.* **16** : 5178-5187.

Summers, D.K. et D.J. Sherratt (1984). Multimerization of high copy number plasmids causes instability : ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell* **36** : 1097-1103.

Summers, D.K., Beton, C.W.H. et H.L. Withers (1993). Multicopy plasmid instability : the dimer catastrophe hypothesis. *Mol. Microbiol.* **8** : 1031-1038.

Summers, D. (1998). Timing, self-control and a sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability. *Mol. Microbiol.* **29** : 1137-1145.

Sunnerhagen, M., Nilges, M., Otting, G. et J. Carey (1997). Solution structure of the DNA-binding domain and model for the complex of multifunctional hexameric arginine repressor with DNA. *Nature Struct. Biol.* **4** : 819-826.

Tannock, G.W., Fuller, R. et K. Pedersen (1990). *Lactobacillus* succession in the piglet digestive tract demonstrated by plasmid profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** : 1310-1316.

Thyagarajan, B., Guimaraes, M.J., Groth, A.C. et M.P. Calos (2000). Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene* **244** : 47-54.

Tian, G., Lim, D., Carey, J. et W.K. Maas (1992). Binding of the arginine repressor of *Escherichia coli* K12 to its operator sites. *J. Mol. Biol.* **226** : 387-397.

Tribble, G., Ahn, Y.-T., Lee, J., Dandekar, T. et M. Jayaram (2000). DNA recognition, strand selectivity, and cleavage mode during integrase family site-specific recombination. *J. Biol. Chem.* **275** : 22 255-22 267.

Van Duyne, G.D., Ghosh, G., Maas, W.K. et P.B. Sigler (1996). Structure of the oligomerization and L-arginine binding domain of the arginine repressor of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **256** : 377-391.

Villion, M. et G. Szatmari (1998). Cloning and characterisation of the *Proteus mirabilis xerD* gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**: 83-90.

Vogel, R.F. et M. Ehrmann (1996). Genetics of lactobacilli in food fermentations. *Biotech. Ann. Rev.* **2** : 123-150.

Wang, H., Glansdorff, N. et D. Charlier (1998). The arginine repressor of *Escherichia coli* K-12 makes direct contacts to minor and major groove determinants of the operators. *J. Mol. Biol.* **277** : 805-824.

Wang, T.-T. et B.H. Lee (1997). Plasmids in *Lactobacillus*. *Crit. Rev. Biotech.* **17** : 227-272.

Yamazoe, M., Onogi, T., Sunako, Y., Niki, H., Yamanaka, K., Ichimura, T. et S. Hiraga (1999). Complex formation of MukB, MukE and MukF proteins involved in chromosome partitioning in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **18** : 5873-5884.

Yu, D., Ellis, H.M., Lee, E.-C., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. et D.L. Court (2000). An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA* **97** : 5978-5983.

Yu, X., Weihe, E.K. et W. Margolin (1998). Role of the C terminus of FtsK in *Escherichia coli* chromosome segregation. *J. Bacteriol.* **180** : 6424-6428.

Yu, X.C. et W. Margolin (1999). FtsZ ring clusters in *min* and partition mutants : role of both the Min system and the nucleoid in regulating FtsZ ring localization. *Mol. Microbiol.* **32** : 315-326.

Zechiedrich, E.L. et N. Cozzarelli (1995). Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **9** : 2859-2869.

## Annexe 1

Séquence en nucléotides et en acides aminés de

*L. caseii xerD*

5' atgcatgggt tgattgctga ttttattcat tatctggatg ttgagcgcgg gctggccca  
acaacgcagg tcagctatca gcaggattta accaccttta tggettgggt aagcgaccaa  
aagcaaaca ctttccga agatttggg gttattcagg cgttctaaa gcatcaaat  
gataccaag cgcctgcac agtcagtcga atgattcgg cgttacgca gtttaccgg  
ttctgttac gcgaaggcgc cattaagtct gaccgatga ccaaatcga taccctaaa  
aaagcacaac atttaccgc cacattatca gggacggaaa ttgatgctt gatggcaag  
ccgatacca ctaagccgtt gggattgctg gatcgcgcta ttttgagct gatgatgcg  
actggcttc gggatcgga agttgtcga ttgcgattg atcagttaca ttagcaatg  
aacttgctc aggttaccg aaaaggcgt aaggagcgac tggttcaat cagtcccaa  
gcagccgatt gggtaaccg gtattgcag gaatcccgc cgcgttgat caaacaccg  
caaccaagg cagtgtcgt caacttcat ggtcatcgc tcaccgca agtaattgg  
aagaatctga aagcctat tgcaagtgt ggcattgaaa aggatgtaac accgatacg  
ttacggcaca gtttgcac gcgtctgtg gaaaatggcg ccgatttac ggtggtcag  
gagttactgg ggcatagtga tattagtacc acccaatct atacatct gagtaatcag  
catctagtgg cggttatca taaacccat cctcgtggct aa

882 nucléotides

MHGLIADFIH YLDVERGLAR TTQVSYQQDL TTFMAWLSOQ  
KQTTFPEDFG VIQAFLKHQN DTKAPASVSR MISALRKFYR  
FLLREGAIIKS DPMTKIDTPK KAQHLPATLS GTEIDALMAK  
PDTTKPLGLR DRAIFELMYA TGLRVSEVVG LRLDQLHLAM  
NLLQVTGKGD KERLVPISPQ AADWVNRYLQ ESRPRLIKHQ  
QPKAVFVNFH GHALTRQVIW KNLKAYIASV GIEKDVTPTH  
LRHSFATRLI ENGADLRVVQ ELLGHSDIST TQIYTHLSNQ  
HLVAVYHKTH PRG\*

293 acides aminés

## Remerciements

J'aimerais premièrement remercier le Dr George Szatmari pour la confiance qu'il m'a accordé en m'acceptant dans son laboratoire. Je tiens aussi à souligner l'aide apportée par mes collègues de travail Manuela Villion, Dimitri Vzdornov, Nadine Héroux, Loubna Jouan, François Aller et Hélène Sénéchal. Tout au long de ma maîtrise, les nombreuses discussions, scientifiques ou non, arrosées ou non, mais jusqu'à tard dans la nuit avec les camarades Éric Massé, Charles Fortin, Ihmad Baaklini et Jean-François Viger, m'ont permis d'apprécier ces quelques années tout en remaniant certaines théories.

Bien sûr, ces années auraient été plus difficiles sans le soutien et l'amour apporté par Karine Bernard. Sa douce présence, tant à l'université qu'à l'extérieur, aura permis de passer de très beaux moments, même si nous n'avons pu faire tout ce qui était planifié. Je tiens aussi à remercier mes parents qui m'ont beaucoup supportés et encouragés tout au long de ma maîtrise. Grâce à leur aide et leur support généreux et inconditionnel j'ai pu continuer mes longues études.

Et finalement, vu que la science n'est pas tout, je veux remercier tous les idéalistes qui, un jour, ont pris la plume, le pinceau, la guitare ou le masque à gaz pour défendre et propager leurs idées.