



Université de Montréal

**Rôle des topoisomérases de type IA dans la  
ségrégation des chromosomes chez *Escherichia coli***

par  
Cynthia Tanguay

Département de Microbiologie et Immunologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences  
en microbiologie et immunologie

Décembre, 2010

© Cynthia Tanguay, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Rôle des topoisomérases de type IA dans la ségrégation des chromosomes chez  
*Escherichia coli*

présenté par :  
Cynthia Tanguay

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

France Daigle, président-rapporteur  
Marc Drolet, directeur de recherche  
George Szatmari, membre du jury

## Résumé

Les topoisomérases I (*topA*) et III (*topB*) sont les deux topoisomérases (topos) de type IA d'*Escherichia coli*. La fonction principale de la topo I est la relaxation de l'excès de surenroulement négatif, tandis que peu d'information est disponible sur le rôle de la topo III. Les cellules pour lesquelles les deux topoisomérases de type IA sont manquantes souffrent d'une croissance difficile ainsi que de défauts de ségrégation sévères. Nous démontrons que ces problèmes sont majoritairement attribuables à des mutations dans la gyrase qui empêchent l'accumulation d'excès de surenroulement négatif chez les mutants sans *topA*. L'augmentation de l'activité de la gyrase réalisée par le remplacement de l'allèle *gyrB*(Ts) par le gène de type sauvage ou par l'exposition des souches *gyrB*(Ts) à une température permissive, permet la correction significative de la croissance et de la ségrégation des cellules topos de type IA. Nous démontrons également que les mutants *topB* sont hypersensibles à l'inhibition de la gyrase par la novobiocine. La réplication non-régulée en l'absence de *topA* et de *rnhA* (RNase HI) augmente la nécessité de l'activité de la topoisomérase III. De plus, en l'absence de *topA* et de *rnhA*, la surproduction de la topoisomérase III permet de réduire la dégradation importante d'ADN qui est observée en l'absence de *recA* (RecA). Nous proposons un rôle pour la topoisomérase III dans la ségrégation des chromosomes lorsque l'activité de la gyrase n'est pas optimale, par la réduction des collisions fourches de réplication s'observant particulièrement en l'absence de la topo I et de la RNase HI.

**Mots-clés** : topoisomérase de type IA, gyrase, RNase HI, ségrégation des chromosomes, réplication, décaténation, division cellulaire, précaténane, surenroulement de l'ADN, *Escherichia coli*.



## Abstract

*E. coli* possesses two type IA topoisomerases (topos), namely topo I (*topA*) and topo III (*topB*). The major function of topo I is the relaxation of excess negative supercoiling. Much less is known about the function of topo III. Cells lacking both type IA topos suffer from severe chromosome segregation and growth defects. We show that these defects are mostly related to the presence of gyrase mutations that prevent excess negative supercoiling in *topA* null mutants. Indeed, increasing gyrase activity by spontaneous mutations, by substituting a *gyrB*(Ts) allele for a wild-type one or by exposing cells carrying the *gyrB*(Ts) allele to permissive temperatures, significantly corrected the growth and segregation defects of cells lacking type IA topo activity. We also found that *topB* mutants are hypersensitive to novobiocin due to gyrase inhibition. Our data also suggest that unregulated replication occurring in the absence of *topA* and *rnhA* (RNase HI) exacerbates the need for topo III activity. Moreover, when *topA* and *rnhA* were absent, we found that topo III overproduction reduced the extensive DNA degradation that took place in the absence of *recA* (RecA). All together, our results lead us to propose a role for topo III in chromosome segregation when gyrase activity is suboptimal, thus reducing replication forks collapse, especially when replication is unregulated due to the absence of topo I and RNase HI.

**Keywords** : type IA topoisomerase, gyrase, RNase HI, chromosome segregation, replication, decatenation, cell division, precatenane, DNA supercoiling, *Escherichia coli*

# Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiv
1. Revue de littérature.....	1
1.1 La structure de l'ADN.....	1
1.2 Les topoisomérases.....	5
1.2.1 Les topoisomérases de type IA.....	6
1.2.2 Les topoisomérases de type IB.....	9
1.2.3 Les topoisomérases de type IIA et IIB.....	10
1.3 Le contexte de la ségrégation des chromosomes.....	14
1.3.1 Réplication de l'ADN.....	15
1.3.2 Division cellulaire.....	29
1.3.3 Autres activités sur l'ADN.....	30
1.4 Les problèmes de ségrégation : causes et conséquences.....	35
1.4.1 Au niveau de l'organisation du chromosome.....	36
1.4.2 Au niveau de la réplication.....	37
1.4.3 Au niveau de la recombinaison.....	44
1.4.4 Au niveau de la décaténation.....	47
1.4.5 Le double mutant <i>topA rnhA</i> .....	48
1.4.6 Objectifs.....	48
2. Résultats.....	50
2.1 Introduction à l'article.....	50
2.2 Interplay between type IA topoisomerases and gyrase in chromosome segregation in <i>Escherichia coli</i> .....	51
3. Discussion.....	106
3. 1 Le triple mutant <i>gyrB<sup>TS</sup> topA rnhA</i> .....	106
3.1.1 Cause de la létalité.....	106

3.1.2 Effet de RecA.....	107
3.1.3 Suppresseurs spontanés.....	109
3.1.4 Introduction de l'allèle <i>gyrB</i> <sup>+</sup> .....	109
3.2 Rôle de la topoisomérase III .....	110
3.2.1 Site d'action .....	110
3.2.2 Lien avec la gyrase.....	111
3.3 Le triple mutant <i>gyrB</i> <sup>TS</sup> <i>topA topB</i> .....	113
3.3.1 Conséquences de la mutation <i>gyrB</i> <sup>TS</sup> .....	113
3.3.2 Correction de <i>gyrB</i> <sup>TS</sup> par <i>topA</i> .....	114
3.3.2 Thermo-sensibilité du triple mutant.....	115
3.4 Rôle des topoisomérases de type IA dans la ségrégation des chromosomes .....	116
4. Perspectives.....	119
5. Sources documentaires.....	121
6. Annexe .....	132
6. 1 Résultats supplémentaires.....	132
6. 2 Article .....	142

## Liste des tableaux

### Section 1. Revue de littérature

<b>Tableau I</b> Sites d'action des topoisomérases et de la RNase HI d' <i>Escheichia coli</i> ...	14
--	----

### Section 2. Résultats

<b>Tableau I</b> Overproducing RuvABC had no effect on the growth and chromosome segregation defects of strain SB383 .....	90
--	----

<b>Tableau II</b> <i>Escherichia coli</i> strains used in this study .....	91
--	----

### Section 6. Annexe

#### Section 6.1 Résultats supplémentaires

<b>Tableau I</b> Changement d'expression génique (« <i>fold change</i> ») suivant la déplétion de la RNase HI .....	132
---	-----

#### Section 6.2 Article

<b>Tableau I</b> <i>Escherichia coli</i> strains used in this study I .....	168
---	-----

## Liste des figures

### Section 1. Revue de littérature

<b>Figure 1</b> Le surenroulement de l'ADN .....	3
<b>Figure 2</b> Mécanisme d'action des topoisomérases de type IA .....	8
<b>Figure 3</b> Mécanisme d'action des topoisomérases de type IB .....	9
<b>Figure 4</b> Mécanisme d'action des topoisomérases de type IIA.....	11
<b>Figure 5</b> Mode d'ouverture du duplex à <i>oriC</i> .....	15
<b>Figure 6</b> Réplication de l'ADN .....	18
<b>Figure 7</b> Formation de précaténanes lors de la réplication.....	20
<b>Figure 8</b> Réparation par recombinaison homologue .....	22
<b>Figure 9</b> Formation d'un intermédiaire de réplication tardif.....	24
<b>Figure 10</b> Résolution d'intermédiaires de réplication tardifs par les topoisomérases de type IIA .....	25
<b>Figure 11</b> Résolution d'intermédiaires de réplication tardifs par les topoisomérases de type IA.....	26
<b>Figure 12</b> Mécanisme de réplication bidirectionnelle à partir d'un R-loop par cSDR .....	33
<b>Figure 13</b> Problèmes de ségrégation .....	35
<b>Figure 14</b> Mesure du synchronisme par cytométrie .....	38
<b>Figure 15</b> Résolution de doubles jonctions de Holliday par dissolution.....	43
<b>Figure 16</b> Modèle pour la résolution d'intermédiaires de recombinaison par la topoisomérase III.....	46

## Section 2. Résultats

<b>Figure 1</b> Increasing gyrase activity in strain SB383 allowed growth independent of topo III overproduction .....	92
<b>Figure 2</b> Increasing gyrase activity or deleting the <i>recA</i> gene partially corrected the chromosome segregation defect of strain SB383 .....	94
<b>Figure 3</b> Hypersensitivity of a <i>topB</i> mutant to novobiocin .....	95
<b>Figure 4</b> Complementation of the growth and replication initiation defect of a <i>gyrB</i> (Ts) mutant by deleting the <i>topA</i> gene .....	96
<b>Figure 5</b> The growth problem of a double <i>topA topB</i> is strongly exacerbated by reducing gyrase activity .....	97
<b>Figure 6</b> The effect of reducing gyrase activity on cell morphology and DNA content of a double <i>topA topB</i> mutant.....	98
<b>Figure 7</b> Unregulated replication in cells lacking <i>topA</i> and/or <i>rnhA</i> as shown by flow cytometry .....	99
<b>Figure 8</b> Growth analysis, DNA degradation measurement and microscopic examination of cell morphology and DNA content in <i>recA</i> <sup>-</sup> -derivatives of strain SB383 .....	100
<b>Figure S1</b> Correction by <i>recA</i> <sup>-</sup> and <i>gyrB</i> <sup>+</sup> derivatives of SB383 .....	103
<b>Figure S2</b> Effect of temperature on <i>topA gyrB</i> (Ts) and <i>topA topB gyrB</i> (Ts).....	105

## Section 6. Annexe

### Section 6.1 Résultats supplémentaires

<b>Figure 1</b> Cibles de la novobiocine selon les concentrations utilisées .....	134
<b>Figure 2</b> Correction des défauts de ségrégation par l'expression de la topoisomérase III à de très hauts niveaux .....	135
<b>Figure 3</b> Thermo sensibilité d'une souche <i>gyrB</i> <sup>TS</sup> <i>topB</i> .....	136

<b>Figure 4</b> Viabilité d'un triple mutant <i>gyrB<sup>TS</sup> topA recQ</i> .....	137
<b>Figure 5</b> Sensibilité de d'une souche <i>recQ</i> à la novobiocine .....	138
<b>Figure 6</b> Amplification génique .....	140
<b>Section 6.2 Article</b>	
<b>Figure 1</b> Supercoiling in a <i>topA rnhA</i> null double mutant .....	170
<b>Figure 2</b> Supercoiling in a <i>topA rnhA</i> null double mutant after transcription inhibition .....	172
<b>Figure 3</b> Western blot analysis to measure topoisomerase IV and gyrase levels in <i>topA rnhA</i> mutants .....	173
<b>Figure 4</b> Complementation of a <i>topA rnhA</i> mutant by topoisomerase III overproduction .....	174
<b>Figure 5</b> Topoisomerase IV inhibition does not promote hypernegative supercoiling in a double <i>topA rnhA</i> mutant .....	175
<b>Figure 6</b> GyrI, a gyrase inhibitor, plays no role in supercoiling inhibition in a <i>topA rnhA</i> null double mutant .....	176
<b>Figure 7</b> Supercoiling assays in crude cell extracts.....	177
<b>Figure 8</b> Topoisomerase III overproduction does not change supercoiling in a <i>topA rnhA</i> null double mutant .....	181
<b>Figure 9</b> DAPI staining of <i>topA rnhA</i> null mutants reveals segregation defects that are corrected by topoisomerase III overproduction .....	182

## Liste des abréviations

1', 3' et 5' : 1 prime, 3 prime et 5 prime

° : degré

A : adénine

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNdb : ADN double brin

ADNsb : ADN simple brin

ADP : adénosine diphosphate

ADPNP : 5'adénylyl- $\beta,\gamma$ -imidodiphosphate

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

ATPase : adénosine triphosphatase

Barrière-C : barrière située en C-terminal

Barrière-N : barrière située en N-terminal

C : cytosine

cSDR : « *constitutive stable DNA replication* »

C-terminal : carboxy-terminal

DAPI : 4', 6-diamidino-2-phénylindole

*datA* : « *DnaA titration* »

DJH : doubles jonctions de Holliday

dNTP : désoxyribonucléoside triphosphate

DUE : « *DNA unwinding element* »

*E. coli* : *Escherichia coli*

Fis : « *factor for inversion stimulation* »

G : guanine

GTP : guanosine triphosphate

H-NS : « *heat-stable nucleoid-structural protein* »

HU : « *heat unstable protein* »

IHF : « *integration host factor* »

JH : jonction de Holliday

Kb : kilobase(s)



kDa : kiloDalton(s)

LRI : « *late replication intermediate* »

Lk : « *linking number* »

Lk<sub>0</sub> : Lk d'une molécule d'ADN relaxée

Lrp : « *leucine responsive protein* »

Mb : mégabase(s)

nm : nanomètre(s)

ppGpp : guanosine tétraphosphate

N-terminal : amino-terminal

RIDA : « *regulatory inactivation of DnaA* »

RNase : ribonucléase

*S. cerevisiae* : *Saccharomyces cerevisiae*

Segment-G : segment d'ADN relié à la barrière d'entrée « *gate* »

Segment-T : segment d'ADN transporté

SSB : « *single-stranded DNA binding protein* »

T : thymine

Topo(s) : topoisomérase(s)

TS : thermosensible

Tw : « *twist* »

µm : micromètre(s)

Wr : « *Writhe* »

*Isn't it splendid to think of all the things  
there are to find out about?*

*Lucy Maud Montgomery*

## **Remerciements**

Merci à tous les membres du département de microbiologie et immunologie, à mes partenaires de badminton, à Daniel Morency, Serge Mousseau, Pauline Phoenix, Jean Lauzer, Serge Sénéchal, aux membres actuels du laboratoire et à tous les stagiaires, un merci tout spécial à Flora Nolent, merci à mon directeur de recherche Marc Drolet, merci à tous mes amis, à mes parents, à Karolane et Kévin, et surtout merci à Max!

# 1. Revue de littérature

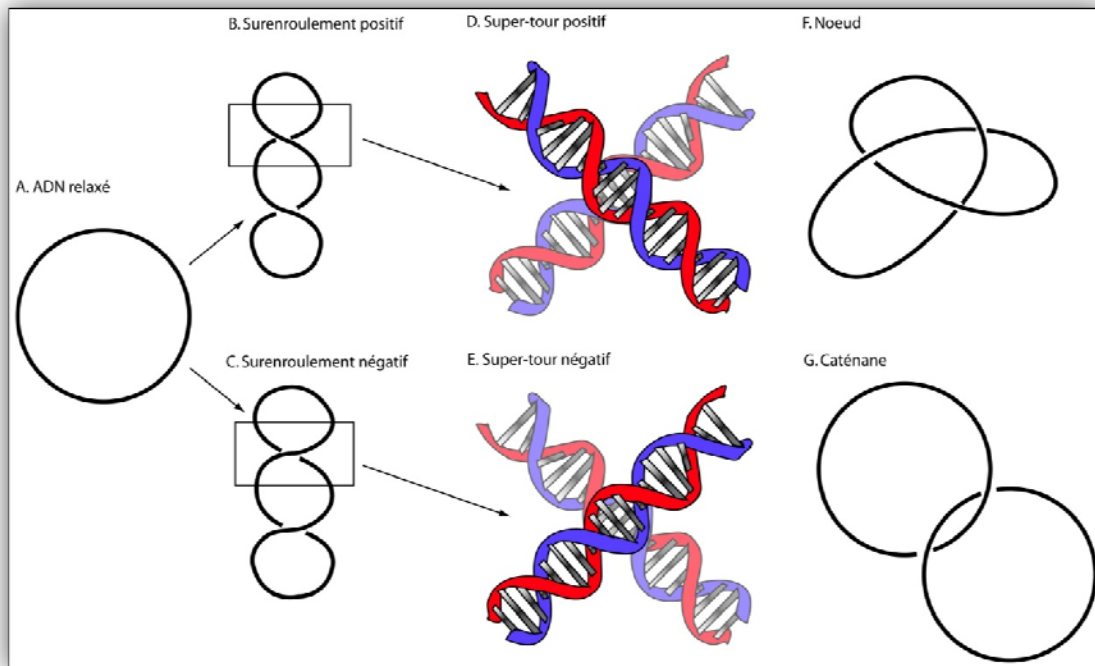
## 1.1 La structure de l'ADN

Quatre nucléotides les uns à la suite des autres dans un ordre variable sont suffisants pour contenir l'information génétique de tout être vivant. Avant que le rôle de l'acide nucléique dans l'hérédité ne soit démontré (Avery *et al.*, 1944), les protéines étaient généralement considérées comme les candidates logiques en raison de leur grande diversité. L'ADN (acide désoxyribonucléique) est composé d'une suite de nucléotides, eux-mêmes formés d'un sucre (désoxyribose), d'un groupement phosphate et de l'une des quatre paires des bases, soit l'adénine, la cytosine, la guanine ou la thymine (A, T, C, G). Le ribose est un sucre à cinq carbones et le carbone auquel est relié une des quatre bases est le carbone 1', le groupement phosphate du nucléotide précédent est attaché au carbone 5' et le groupement phosphate du prochain nucléotide de la chaîne sera joint à partir du carbone 3' de ce même ribose, d'où l'orientation 5'-3' de l'ADN.

Plus de 80 ans après l'isolement de l'ADN et le début de son étude par Johan Friedrich Miescher en 1869 (Dahm, 2008), l'élucidation de son arrangement dans l'espace a eu un impact formidable. Basée sur les études de patrons au rayon X de Rosalind Franklin et de Maurice Wilkins, la structure proposée par James Watson et Francis Crick expliquait également de quelle manière le matériel génétique pourrait être copié (Watson & Crick, 1953a, Watson & Crick, 1953b). L'ADN forme une double hélice où chacune de ses deux hélices est constituée d'une chaîne de phosphates et de sucres. Les bases forment l'intérieur de la structure en s'appariant deux-à-deux entre les hélices avec des liaisons hydrogènes. Chaque base ne peut s'apparier qu'avec une seule autre base pour faire en sorte qu'elles soient bien alignées : l'adénine avec la thymine (deux liaisons hydrogènes) et la cytosine avec la guanine (trois liaisons hydrogènes). Ainsi, la séquence d'une hélice dicte la séquence de l'hélice complémentaire. Ces deux hélices sont antiparallèles, c'est-à-dire que l'une est en 5'-3' et que la seconde sera en 3'-5'. La forme B constitue l'aspect classique de l'ADN où il faut 10,5 paires de bases pour que l'hélice effectue un tour complet. Chaque paire de base effectue donc une rotation d'environ 36°, donnant à la

molécule l'allure d'une vrille alternant entre un petit sillon et un grand sillon. L'hélice est maniable et peut également adopter des structures différentes, notamment des quadruplex G-riches et des triplex, de l'ADN-Z dont l'orientation est contraire à l'ADN-B, des structures en épingles avec des répétitions directes, de l'ADN étiré ainsi qu'une dizaine d'autres formes supplémentaires. L'ADN non-B peut servir de point de reconnaissance à certaines protéines (Rohs *et al.*, 2009) et même être la source de maladies humaines (Bacolla & Wells, 2009).

Considérant que les extrémités d'une molécule d'ADN ne sont pas libres, dans le cas d'*Escherichia coli* parce que son chromosome est circulaire (Cairns, 1963), alors sa topologie ne peut être modifiée que si la molécule est brisée (Deweese *et al.*, 2008). Une molécule d'ADN de structure B sera dite relaxée si elle n'est sous aucune tension (figure 1A). La forme d'ADN relaxée a donc un nombre de liaison égal au  $Lk_0$ . Le  $Lk$  ou « *linking number* » représente la somme de tous les croisements dans la molécule. Plus précisément, c'est l'addition du « *twist* » ( $Tw$ ) et du « *writhe* » ( $Wr$ ). Le  $Tw$  correspond à chaque tour entre les deux brins de la double hélice sous la forme d'une vrille, soit une fois toutes les 10,5 paires de bases si l'ADN est relaxé. La double hélice s'enroule également sur elle-même de façon plectonémique, ce qui correspond au  $Wr$ . Le surenroulement de la double hélice est positif (figure 1B, D) s'il est dans le même sens que la rotation adoptée par les deux brins de l'hélice. L'ADN se trouve alors surenroulé et le  $Lk$  d'une molécule surenroulée positivement sera plus élevé que le  $Lk_0$ . Si l'ADN est enroulé dans le sens inverse de l'hélicité, le surenroulement sera négatif (figure 1C, E); la molécule est alors sous-enroulée ( $Lk < Lk_0$ ). Le surenroulement négatif favorise l'ouverture des brins de l'ADN et est donc une source d'énergie pour plusieurs processus. Une molécule emmêlée sur elle-même forme un nœud (figure 1F) et l'entremêlement de deux molécules différentes forme un caténane (figure 1G).



**Figure 1 Le surenroulement de l'ADN.** Représentation d'une molécule d'ADN relaxée (A), surenroulée positivement (B, D) ou négativement (C, E), d'un nœud (F) et d'un caténane (G). Les lignes noires représentent chacune une double hélice d'ADN. Se référer au texte pour les détails supplémentaires.

Contrairement aux eucaryotes, la bactérie ne possède pas d'histones autour desquelles enrouler son chromosome afin de le compacter. Chez *E. coli*, plusieurs mécanismes sont utilisés afin d'effectuer une compaction d'un facteur de 1000 pour contenir son chromosome de 4,6Mb dans une cellule longue de 2  $\mu\text{m}$  (Holmes & Cozzarelli, 2000). L'enroulement de l'ADN peut devenir un obstacle à son accessibilité, mais le surenroulement négatif joue également un rôle non-négligeable au niveau de la compaction de l'ADN. Le nucléoïde est compacté par MukBEF (*mukBEF*) qui, en présence d'ATP, peut se replier sur lui-même en donnant une torsion positive à l'ADN (Hardy *et al.*, 2004). D'une manière intéressante, une hausse du surenroulement négatif permet de corriger un système MukBEF inhibé (Sawitzke & Austin, 2000), démontrant la coopération de ces deux mécanismes pour condenser le chromosome et, par le fait même, pour faciliter sa ségrégation (Holmes & Cozzarelli, 2000).

Toutefois, le chromosome ne peut se contenter d'être condensé à la manière d'une balle de laine puisque l'ADN situé à l'intérieur devra également être accessible. Plusieurs autres protéines se liant à l'ADN vont ainsi contribuer à donner une structure au nucléoïde et puisque ces protéines dictent quelle portion de l'ADN sera disponible, leur rôle est souvent associé à la régulation (Dame, 2005). La coopération de plusieurs molécules de H-NS « *histone-like nucleoid structuring protein* » (*hns*) peut faire un pont entre les différents segments d'ADN et sa liaison contraint le surenroulement de l'ADN (Dame *et al.*, 2000). Des dimères de Lrp « *leucine responsive protein* » (*lrp*) peuvent également créer un pont dans l'ADN, tandis que l'ADN peut s'enrouler autour de sa forme octamérique (Beloin *et al.*, 2003). Ces différents modes de liaison reflètent les rôles partagés d'organisation et de régulation (Newman & Lin, 1995). HU « *heat unstable protein* » (*hupAB*), IHF « *integration host factor* » (*ihfAB*) et Fis « *factor for inversion stimulation* » (*fis*) peuvent tous trois plier l'ADN à différents degrés. HU se lie préférentiellement à l'ADN surenroulé, mais il n'a pas de séquence de liaison spécifique associée (Shindo *et al.*, 1992). IHF et Fis peuvent se lier de façon non-spécifique à l'ADN et contribuer à la compaction du chromosome. Toutefois, ils possèdent aussi des sites de liaison spécifiques et jouent un rôle de régulation. Par exemple, les sites d'IHF se retrouvent majoritairement près des promoteurs et la liaison d'IHF active leur transcription (Goosen & van de Putte, 1995). D'ailleurs, les protéines de liaison à l'ADN peuvent entrer en compétition pour certains sites ainsi qu'avoir des effets coopératifs ou antagonistes. Par exemple, l'expression des fimbriae d'une souche d'*Escherichia coli* pathogène est activée en présence d'ADN relaxé, d'IHF et de LRP tandis que H-NS favorise son inactivation (Corcoran & Dorman, 2009). Il n'est donc pas surprenant que l'expression de toutes ces protéines variera selon la phase de croissance, avec des concentrations maximales à des périodes différentes (Ali Azam *et al.*, 1999).

Le nucléoïde est donc une structure dynamique dont les sites accessibles sont variables. Également, par manque d'espace, la cellule ne peut décondenser son chromosome entier pour y accéder et la condensation est donc étroitement liée à la formation de domaines. Les domaines topologiques composant le chromosome ont une taille moyenne de 10 kb et un domaine équivaut à la région du chromosome qui

serait relaxée suite à un bris dans l'ADN (Postow *et al.*, 2004). En effet, sans la présence de barrières sur l'ADN, un seul bris de la molécule aurait des conséquences désastreuses pour la cellule, relâchant toute l'énergie emmagasinée dans le surenroulement négatif et perdant toute forme d'organisation. Les domaines peuvent être de taille variable et ne sont pas nécessairement localisés aux mêmes endroits, étant formés par toute protéine solidement fixée à l'ADN, ou même par des processus cellulaires comme la transcription ou la traduction (Postow *et al.*, 2004). Le chromosome est également divisé en macro-domaines; soit des régions de localisation homogène et avec peu d'interactions entre elles (Espeli & Boccard, 2006). Ces secteurs seraient déterminés par leurs propres facteurs de structure leur assurant une localisation précise. Pour le moment, quatre macro-domaines sont reconnus chez *E. coli* (Ori, Ter, Gauche et Droit) et ils expliqueraient à divers niveaux comment les chromosomes répliqués sont séparés et migrent aux endroits appropriés dans la cellule (Espeli & Boccard, 2006).

## 1.2 Les topoisomérases

*« [U]n niveau considérable de déroulement serait nécessaire (...) Malgré qu'il soit difficile pour le moment d'envisager comment ces processus ont lieu sans que tout ne s'emmêle, nous ne croyons pas que cette objection sera insurmontable. »*

*(Watson & Crick, 1953a)*

Ainsi, la structure même de l'ADN occasionne des tensions topologiques, des molécules d'ADN entremêlées et même des nœuds. Suite à la publication des travaux de Watson et Crick (Watson & Crick, 1953a, Watson & Crick, 1953b), la communauté scientifique de l'époque a immédiatement envisagé la formation de ces structures et leur résolution était une source de débat (Delbruck, 1954). La solution de la cellule se trouve dans les topoisomérases (topos), des enzymes retrouvées tant chez les procaryotes, les eucaryotes unicellulaires et jusqu'aux humains (Wang, 2002). Par leur capacité de cliver et de relier l'ADN, les topoisomérases peuvent agir sur un seul brin d'ADN à la fois et ainsi changer le Lk un tour à la fois (type I) ou alors agir sur les deux brins d'ADN et modifier le Lk deux tours à la fois (type II). Elles sont par la suite divisées en sous-catégories selon leur structure et leur mode d'action. Considérant leur rôle central pour toute cellule, de nombreux antibiotiques comme les



quinolones (Drlica *et al.*, 2008) et même des anti-cancéreux comme la camptothécine (Pommier, 2009) en font leur cible.

### 1.2.1 Les topoisomérases de type IA

Tous les domaines de la vie contiennent au moins une topoisomérase de type IA (Wang, 2002), notamment les topoisomérases I et III d'*Escherichia coli*, la topoisomérase III de *Saccharomyces cerevisiae*, les topois III $\alpha$  et III $\beta$  propres aux mammifères ainsi que la gyrase inverse de l'archae-bactérie *Sulfolobus acidocaldarius*.

Les topoisomérases de type IA effectuent la relaxation d'un substrat d'ADN surenroulé négativement. Puisque le surenroulement négatif favorise l'ouverture des brins, il a été postulé que ce type de topo a besoin d'ADN simple brin (ADNsb) (Wang, 1971). En effet, il est possible de relaxer de l'ADN surenroulé positivement seulement si ce substrat contient déjà une région d'ADN simple brin (Kirkegaard & Wang, 1985). Donc, au fur et à mesure que la topoisomérase relaxe l'ADN surenroulé, celui-ci ne devient plus un bon substrat et les topois de type IA ne peuvent donc pas faire de relaxation complète. L'activité de relaxation requiert des cations, tel le magnésium, bien que les raisons soient encore obscures. Elles peuvent également faire ou défaire des nœuds, de même que la caténation ou la décaténation de molécules d'ADN simple brin circulaires ou d'ADN double brin (ADNdb) qui contiennent un bris dans l'ADN (Wang, 1996).

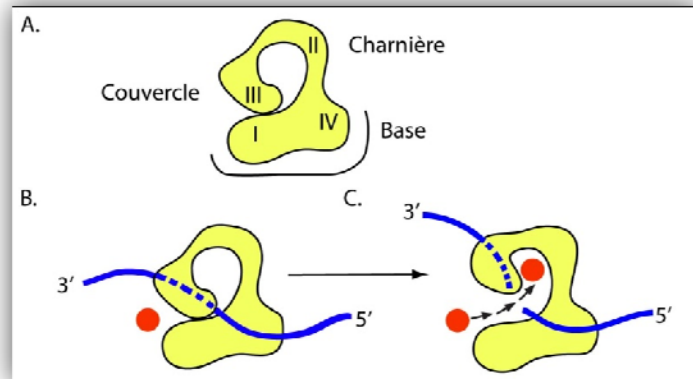
La première topoisomérase a été isolée chez *E. coli* sous l'appellation de protéine oméga ( $\omega$ ) par James Wang (Wang, 1971); elle est maintenant nommée topoisomérase I et elle est encodée par le gène *topA* (Trucksis & Depew, 1981). Sa structure est considérée comme le prototype des topois de type IA (Champoux, 2001). Les acides aminés en N-terminal de la séquence composent les domaines de clivage et de passage de brins qui comprennent la tyrosine active (Lima *et al.*, 1993). La séquence en C-terminal contribue à la liaison à l'ADN simple brin *in vivo* (Beran-Steed & Tse-Dinh, 1989). Entre ces deux domaines se trouve un domaine de liaison au zinc qui aiderait au passage du second brin d'ADN (Tse-Dinh, 1991).

*E. coli* possède une deuxième topoisomérase de type IA, soit la topoisomérase III (*topB*) (Dean *et al.*, 1983, Srivenugopal *et al.*, 1984). La séquence des domaines N-terminal de ces deux topos est très similaire. Toutefois, la topo III ne possède pas le domaine de liaison au zinc et il n'y a aucune homologie de séquence entre leurs domaines C-terminaux (Zhang *et al.*, 1996). La structure en trois dimensions de la topo III est très semblable à celle de la topo I. L'enzyme monomérique est divisée en quatre domaines. Il y a une fente formée entre le domaine III et les domaines I et IV tandis que le domaine II sert de liaison (figure 2A). La structure est particulièrement conservée au niveau du domaine III et de la tyrosine active (Mondragon & DiGate, 1999). Toutefois, quelques différences sont observées. Le site de liaison à l'ADN est plus profond chez la topo III. Également, deux séquences formant des boucles sont insérées dans cette topoisomérase. La boucle 241-255 n'a toujours pas de rôle attribué, mais la seconde boucle inhibe l'activité de décaténation lorsqu'elle est retirée (Li *et al.*, 2000). Cette région interagit directement avec l'ADN et conférerait la propriété d'agir plusieurs fois de suite sur la molécule d'ADN, d'où l'action de décaténation. Ainsi, *in vitro*, la topo III, mais pas la topo I, peut décaténer deux molécules d'ADN (Hiasa *et al.*, 1994).

Les topoisomérases I et III ont donc des différences de structures qui reflètent un rôle différent *in vivo*, de même qu'une spécificité de substrat distincte. Lorsqu'un substrat d'ADN surenroulé est fourni à ces topoisomérases, il est possible d'observer leur capacité de relaxation. Alors que la topoisomérase I parvient à relaxer efficacement à une température de 30 °C, la topo III est beaucoup plus efficace à une température de 52 °C (DiGate & Marians, 1988). L'augmentation de la température sépare les brins d'ADN plus facilement, démontrant que la topoisomérase III nécessite strictement un substrat d'ADN simple brin. Donc, des conditions favorisant l'ouverture du duplex, telles une haute température ou un fort niveau de surenroulement négatif dans l'ADN, vont être demandées pour la topo III tandis qu'un court segment d'ADNsb près d'ADNdb sera suffisant à la topoisomérase I (Wang, 1996).

L'attachement d'une topo de type IA à son substrat d'ADN simple brin modifie la conformation de façon à ce qu'un groupement hydroxyl provenant d'une tyrosine du domaine III puisse attaquer le phosphore en 5' de la molécule d'ADN (figure 2B).

Un lien ester covalent sera ainsi formé entre la topoisomérase et l'ADN. Il est nécessaire que l'enzyme demeure attachée aux deux extrémités de l'ADN



suite au bris pour permettre l'étape subséquente de ligation des brins. Ce mécanisme d'action représenté à la figure 2 est

**Figure 2 Mécanisme d'action des topoisomérases de type IA.** A. La structure en quatre domaines. B. L'enzyme est attachée à l'ADNs (ligne bleue). C. Le second brin d'ADNs (cercle rouge) passe au travers du premier brin clivé qui est retenu par la topo. Se référer au texte pour les détails supplémentaires. Figure adaptée avec permission de *Macmillan Publishers Ltd* de (Wang, 2002).

appelé « *enzyme-bridging mechanism* » puisque la topoisomérase agit comme un pont entre les extrémités 3' et 5' de l'ADN (Kirkegaard & Wang, 1985). Pour modifier la topologie de la molécule d'ADN, ce mécanisme implique que le second brin d'ADN puisse également passer : ce second brin appartiendra à la même molécule d'ADN dans le cas d'une relaxation et à une molécule différente dans le cas d'une caténation ou décaténation. Justement, la structure contient un trou d'environ 2,5 nm qui permettrait l'entrée du second brin (Lima *et al.*, 1994). L'entrée serait possible par la capacité du domaine III de se déplacer (déplaçant par le fait même le brin d'ADN clivé) en se servant du domaine II comme d'une charnière, les domaines I et IV formant la base (figure 2C). Suite à l'entrée du brin intact, le brin clivé sera relié par une seconde trans-estérification où l'oxygène du groupement hydroxyl en 3' de l'ADN pourra à son tour attaquer le phosphore du lien ester entre l'ADN et la topo, ce faisant reformant la molécule d'ADN et libérant la topo du lien covalent. La trans-estérification est une réaction spontanée, ce qui explique qu'aucune source d'énergie extérieure comme l'ATP ne soit nécessaire. La réaction sera complétée suite à la

sortie du second brin d'ADN; de multiples rondes successives de passage de brins peuvent également être conduites.

La gyrase inverse, retrouvée chez les bactéries et archaebactéries hyperthermophiles, est effectivement un membre des topoisomérases IA, puisqu'elle clive un seul brin d'ADN et s'y lie en 5' (Jaxel *et al.*, 1989). Toutefois, elle catalyse l'ajout de super-tours positifs de façon ATP-dépendante (Forterre *et al.*, 1985). Cette activité unique est liée à un domaine hélicase joint à la topoisomérase (Confalonieri *et al.*, 1993).

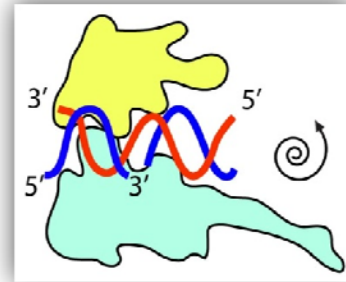
### 1.2.2 Les topoisomérases de type IB

Les topoisomérases de type IB ont d'abord été identifiées chez la souris (Champoux & Dulbecco, 1972) et sont surtout retrouvées chez les eucaryotes (topoisomérase I humaine). La topoisomérase IB eucaryote est généralement large (plus de 90 kDa) alors que celle des virus (*Poxviridae*) et des bactéries (*Bordetella*, *Pseudomonas*, mais pas *E. coli*) est plutôt petite (environ 36 kDa) (Baker *et al.*, 2009).

Les topoisomérases de type IB sont membres de la famille des types I puisqu'elles vont également agir sur un brin d'ADN à la fois. Il s'agit d'un monomère qui est plus apparenté aux recombinases site-spécifique qu'aux topoisomérases de type IA (Cheng *et al.*, 1998). Elles effectuent la relaxation d'ADN surenroulé négativement ou positivement et elles peuvent donc agir sur de l'ADN double brin et elles parviennent à complètement relaxer un substrat (Been & Champoux, 1984). Cette réaction ne requiert pas d'ion divalent. Suite à sa liaison à l'ADN, la tyrosine active de la topoisomérase va également attaquer le phosphore de l'ADN par trans-estérification pour cliver l'ADN. Toutefois, l'angle d'attaque du phosphore est différent et donc l'intermédiaire formé sera une topo liée en 3' de l'ADN et c'est l'extrémité 5' de l'ADN qui sera détachée (Champoux, 1977). Suite au bris dans l'ADN, l'autre extrémité n'est plus solidement attachée à l'enzyme, ce qui permet sa rotation contrôlée selon le modèle du « *DNA rotation mechanism* » (Stewart *et al.*, 1998) (figure 3). Le nombre de rotations effectuées par la molécule

n'est pas connu, mais la rotation devrait théoriquement se poursuivre jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de tension dans l'ADN puisque c'est la seule force qui guide la réaction.

Jusqu'à récemment, la topoisomérase V de *Methanopyrus kandleri* était un des membres des topoisomérases de type IB, mais elle forme maintenant le plus récent groupe des topoisomérases : le type IC (Forterre, 2006). Il s'agit d'une bactérie hyperthermophile et l'activité optimale de cette topo se fait donc à 108 °C. Sa structure n'est apparentée à aucun autre type de topoisomérase connu et il s'agit d'une enzyme combinant l'activité de relaxation des topoisomérases à une activité de réparation de l'ADN (Belova *et al.*, 2001). Elle clive l'ADN un brin à la fois et s'attache à l'extrémité 3' sans nécessiter de magnésium ou de source d'énergie, tout comme les topos de type IB (Slesarev *et al.*, 1993). Elle agit également par un mécanisme de rotation de l'ADN, mais les détails de fonctionnement sont différents de ceux connus jusqu'à présent (Taneja *et al.*, 2007).



**Figure 3 Mécanisme d'action des topoisomérases de type IB.** La topo est liée en 3' et permet la rotation du duplex. Se référer au texte pour les détails supplémentaires. Figure adaptée avec permission de Macmillan Publishers Ltd de (Wang, 2002).

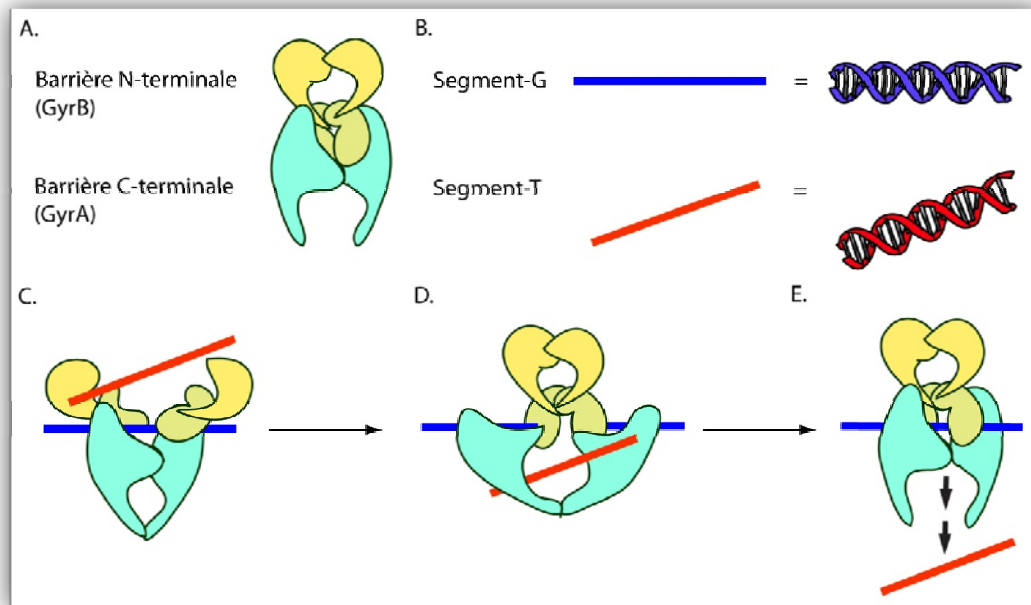
### 1.2.3 Les topoisomérases de type IIA et IIB

Les topoisomérases de type II agissent sur de l'ADN double brin directement et passent une seconde double hélice dans leur ouverture, ce qui fait qu'elles changent le nombre de liaison à l'ADN deux à la fois (Wang, 2002). Si la seconde hélice fait partie de la même molécule, alors elles catalysent la relaxation de l'ADN ou la formation/déformation de nœuds. Dans le cas où la seconde hélice appartient à une molécule d'ADN différente, les topoisomérases de type II effectuent la caténation ou décaténation de ces molécules. Elles agissent sur de l'ADN surenroulé positivement ou négativement. Elles sont divisées entre les types IIA et IIB selon leur structure.

*E. coli* possède deux topoisomérases de type IIA, soit la gyrase qui est composée des sous-unités GyrA et GyrB (*gyrA*, *gyrB*) (Gellert *et al.*, 1976) et la topoisomérase IV formée de ParC et ParE (*parC*, *parE*) (Kato *et al.*, 1990, Kato *et al.*, 1992, Peng

& Mariani, 1993b). La séquence en acide aminés peut être divisée en trois domaines: ParE et GyrB contiennent le domaine N-terminal avec l'activité ATPase alors que ParC et GyrA comprennent le domaine de liaison à l'ADN et de clivage (dont la tyrosine active) ainsi que le domaine C-terminal pour l'interaction avec d'autres protéines. La gyrase comporte également une insertion d'environ 140 paires de bases dans le domaine C-terminal: la spécificité de substrat de la gyrase proviendrait de cette insertion (Wang, 1998). *S. cerevisiae* possède une topoisomérase II, tout comme les mammifères (II $\alpha$  et II $\beta$ ) et trois domaines similaires sont observés, sauf pour la région C-terminale qui est la plus variée (Champoux, 2001). Également, la topoisomérase II des eucaryotes se trouve sous la forme d'un homo-dimère, et non pas d'un hétéro-tétramère, contrairement à celles d'*E. coli*.

Les topos de type II modifient la topologie de l'ADN selon le « *two-gate model* » (Wang, 1998) représenté à la figure 4. La topoisomérase se lie à un segment d'ADN double brin nommé segment-G (segment relié à la barrière d'entrée « *gate* ») (figure



**Figure 4 Mécanisme des deux barrières des topoisomérases de type IIA.** A. Les deux barrières d'une topoisomérase de type IIA. B. Les lignes représentent des doubles hélices. La ligne bleue correspond au segment-G, soit la double hélice clivée par la topo. La ligne rouge correspond au fragment-T qui est transporté au travers du segment-G. C. La topo est liée au segment-G et le segment-T entre dans la barrière N-terminale. D. Le segment-G est clivé par la topo afin de laisser passer la seconde hélice. E. La barrière C-terminale s'ouvre afin de laisser sortir le segment-T. Se référer au texte pour les détails supplémentaires. Figure adaptée avec permission de *Macmillan Publishers Ltd* de (Wang, 2002).

4A-B). À ce moment, la barrière-N (barrière constituée de l'activité ATPase, située en N-terminal) est ouverte, ce qui laisse l'espace nécessaire à l'entrée d'un segment-T (transporté), guidé par des charges positives (figure 4C). L'attachement d'ATP à la topoisomérase change sa structure en refermant la barrière-N et le segment-T est emprisonné dans la chambre formée en haut du segment-G. La modification induite par l'ATP a été confirmée par l'utilisation d'un analogue d'ATP non-hydrolysable (ADP-NP); une topoisomérase liée à ce substrat ne peut plus s'attacher à de nouvelles molécules d'ADN (Roca & Wang, 1992). Suite à ce changement de conformation, les deux tyrosines actives de la topoisomérase peuvent attaquer deux phosphates du segment-G. La séparation des résidus tyrosines va ensuite créer une ouverture dans l'ADN qui sera suffisamment spacieuse pour le passage du segment-T (figure 4D). Le déplacement du segment-T dans cette deuxième chambre formée sous le segment-G serait facilité par la liaison d'une seconde molécule d'ATP. Ce transfert permet à la chambre du haut de se refermer et ce mouvement modifie la taille de la chambre du bas, permettant l'ouverture de la barrière-C (C-terminal) et la sortie du segment-T (figure 4E). L'utilisation d'ADP-NP a également confirmé l'existence de cette seconde barrière, puisque le blocage de la première par l'analogue d'ATP n'empêche pas la sortie du segment-T (Roca & Wang, 1994).

La gyrase d'*Escherichia coli* est un cas particulier de topoisomérase de type IIA, puisqu'elle est la seule à pouvoir insérer des super-tours négatifs dans l'ADN relaxé en présence d'ATP (Gellert *et al.*, 1976). En l'absence d'ATP, elle relaxe l'ADN surenroulé négativement. Elle peut également faire l'activité de décaténation ATP-dépendante comme les autres topoisomérases de type IIA, mais avec très peu d'efficacité; ce mode d'action par la gyrase serait adopté lorsque l'ADN est sous tension (Nollmann *et al.*, 2007). Tel que mentionné précédemment, la gyrase tient son activité particulière au domaine C-terminal de la sous-unité GyrA puisque sa délétion l'empêche d'introduire du surenroulement négatif et elle agit alors comme les topoisomérases de type IIA standards (Kampranis & Maxwell, 1996). Ce domaine permet la liaison de la gyrase à l'ADN (Reece & Maxwell, 1991) de façon à ce qu'elle permette un tour vers la droite à l'ADN. Autrement dit, lorsque la gyrase se lie sur le segment-G, l'approche du segment-T est favorisée pour une région d'ADN juxtaposée au

segment-G, ce qui incite un transport intramoléculaire d'ADN. Une réaction de caténation ou décaténation nécessite plutôt un transport intermoléculaire. De plus, considérant l'enroulement positif (par la droite) réalisé par la gyrase, lorsque le segment-T va traverser le segment-G, le signe sera inversé, d'où l'introduction de super-tours négatifs (Wang, 1998). Également, le transfert du segment-T se produira avec une plus grande efficacité lorsqu'il provient d'un substrat surenroulé positivement (Kampranis *et al.*, 1999).

Les topoisomérases de type II ont donc la capacité de former un nœud ou bien de le défaire. Pareillement, elles peuvent séparer deux chromosomes, mais également les emmêler. Évidemment, l'enzyme ne choisit pas quelle réaction effectuer: c'est la topologie de l'ADN qui dicte la réaction. Plusieurs modèles différents expliquent pourquoi la topo préfère démêler l'ADN plutôt que le contraire et il est probable que plusieurs mécanismes composent la solution (Liu *et al.*, 2009). Par exemple, une topoisomérase pourrait se lier préférentiellement à l'ADN lorsqu'il est accroché à une seconde double hélice à cause de la courbure adoptée (Buck & Zechiedrich, 2004). Il est possible également que la liaison de la topo à l'ADN modifie elle-même l'angle de l'ADN afin de favoriser la prise d'un segment-T dans une molécule emmêlée (Vologodskii *et al.*, 2001). Ensuite, il est envisageable que le substrat favori de la topoisomérase se retrouve plus souvent dans une molécule surenroulée plutôt que relaxée, ce qui ferait qu'en somme, les topos vont agir plus fréquemment pour défaire des nœuds plutôt que l'inverse (Zechiedrich & Osheroff, 1990). Enfin, une étude de mouvement de polymères simulant des chromosomes dans une cellule a déterminé que ceux-ci vont se repousser de manière spontanée (Jun & Mulder, 2006) et cette théorie pourrait donc expliquer pourquoi l'action de décaténation est préférée.

Plus de 25 ans après la découverte de la première topoisomérase, un groupe a identifié une nouvelle classe chez l'archae-bactérie *Sulfolobus shibatae*, le type IIB (Bergerat *et al.*, 1997). Tout comme les types IIA, elle requiert de l'ATP pour la relaxation d'ADN surenroulé ou pour l'action de décaténation, mais il y a très peu de similarité de séquence. Malgré quelques motifs conservés, la structure de la sous-unité A de cette topoisomérase est distincte (Nichols *et al.*, 1999). La liaison à l'ATP



favorise la formation d'un hétéro-tétramère ( $A_2B_2$ ). Il n'y a qu'une seule barrière pour le passage de l'ADN et aucun trou central dans la molécule, mais plutôt un sillon profond (Corbett *et al.*, 2007). Ainsi, suite à l'insertion du segment-G, un changement de conformation en coopération entre les sous-unités doit avoir lieu afin de libérer l'espace pour le segment-T; le mécanisme général demeure néanmoins semblable.

### 1.3 Le contexte de la ségrégation des chromosomes

Les topoisomérases sont des enzymes de choix pour parer aux défis topologiques reliés à la structure en double hélice de l'ADN. Il est indispensable que la cellule sépare correctement les chromosomes répliqués afin qu'ils puissent être distribués aux cellules-filles. Également, la ségrégation se produit dans un contexte où le chromosome circulaire doit demeurer compact et surenroulé, mais également accessible aux diverses activités cellulaires se produisant simultanément. Les activités se déroulant sur l'ADN seront détaillées, avec une attention particulière aux sites d'action des topoisomérases et de la RNase HI, tels qu'énumérés au tableau I.

**Tableau I** Sites d'actions des topoisomérases et de la RNase HI d'*Escherichia coli*

Enzyme	Réplication			Autre
	Initiation	Élongation	Terminaison	
<b>Topo I</b>	Synchronisme Inhibition de l'initiation précoce	N/A	N/A	Surenroulement global Progression de la transcription Prévention de R-loops
<b>Gyrase</b>	Ouverture du duplex	Progression de la fourche	N/A	Surenroulement global Compaction Progression de la transcription
<b>Topo III</b>	N/A	Progression de la fourche si ADNsb	Résolution de LRI Décaténation si surproduite	Résolution d'intermédiaires de recombinaison
<b>Topo IV</b>	N/A	Progression de la fourche si précaténanes	Décaténation	N/A
<b>RNase HI</b>	Contrôle de l'initiation exclusive à <i>oriC</i>	Dégradation des fragments d'Okazaki	N/A	Dégradation de l'ARN des R-loops

Se référer au texte pour les détails supplémentaires et les références. N/A signifie qu'aucun rôle important ou connu n'est associé à cette étape.

### 1.3.1 Réplication de l'ADN

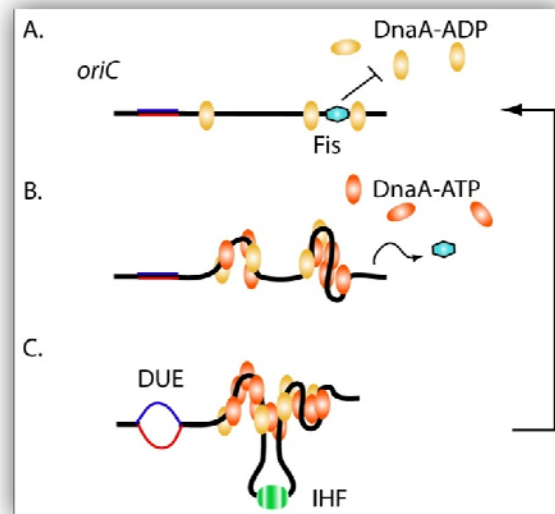
#### 1.3.1.1 Initiation

Le cycle cellulaire est composé d'une période I, (temps entre deux rondes d'initiation), d'une période C (temps de réplication de son chromosome) et d'une période D (temps jusqu'à la division). La cellule assure le synchronisme de son cycle cellulaire par la coopération de plusieurs mécanismes de contrôles et l'initiation de la réplication est une étape hautement régulée (Mott & Berger, 2007). En effet, il est crucial que l'initiation débute au bon endroit et au bon moment.

La réplication du chromosome circulaire d'*E. coli* démarre au site *oriC* par l'ATPase DnaA (*dnaA*). Cette protéine initiatrice se lie aux boîtes DnaA (séquences non-palindromiques de 9pb) qui se retrouvent en plusieurs copies dans la région *oriC*. Quelques copies de DnaA y sont attachées en tout temps (figure 5A), mais certaines

autres régions requièrent une plus grande spécificité, en ayant le DnaA-ATP comme substrat (sites I par exemple) (Speck *et al.*, 1999) (figure 5B). L'agglomération des DnaA est un des facteurs permettant l'ouverture du duplex d'ADN à *oriC* et les protéines de liaison à l'ADN (HU, IHF et Fis) aident à organiser la région pour faciliter cette interaction

(Leonard & Grimwade, 2005). La coopération du surenroulement négatif instauré par la gyrase (Filutowicz, 1980) et de la tension générée par les diverses protéines de liaison à l'ADN facilite la séparation des brins à un site DUE («DNA unwinding element») qui est AT-riche et donc plus facilement ouvert



**Figure 5. Mécanisme d'ouverture du duplex à *oriC*.** **A.** Des DnaA sont attachées en tout temps près de *oriC*. **B.** Au moment de l'initiation, des DnaA-ATP se lie à des sites plus spécifiques. La concentration de Fis diminue pour faire l'espace à plus de DnaA. **C.** La liaison d'IHF crée une forte courbure dans l'ADN et la tension permet la séparation des brins à un site DUE. La ligne noire représente de l'ADN double brin et les lignes bleues et rouges représentent les deux brins du duplex ouvert. Figure adaptée avec permission de Macmillan Publishers Ltd (Mott & Berger, 2007).

(Mott & Berger, 2007) (figure 5C).

L'activation de DnaA sera régulée par RIDA (« *regulatory inactivation of DnaA* ») à l'aide de divers facteurs (DnaN et Hda) qui facilitent l'hydrolyse d'ATP pour obtenir des molécules de DnaA-ADP, la forme inactive (Kato & Katayama, 2001). Les séquences *datA* (« *DnaA titration* ») permettent la liaison d'un grand nombre de molécules DnaA et puisqu'il s'agit d'une des premières régions répliquées, les DnaA en excès sont titrés pour éviter une nouvelle ronde prématurée (Kitagawa *et al.*, 1998). De plus, la méthylase Dam méthyle les séquences GATC (surreprésentées près de l'origine), ce qui donne de l'ADN hémi-méthylé suivant la réplication. SeqA séquestre ces régions hémi-méthylées, rendant *oriC* inaccessible aux protéines comme DnaA suivant une initiation (Nievera *et al.*, 2006).

La richesse du milieu de croissance influence le taux de réplication. La transcription de *dnaA* est inhibée par le ppGpp (guanosine pentaphosphate), soit directement ou indirectement, afin de limiter son expression en conditions de manque de nutriments et inversement en situation de croissance rapide (Zyskind & Smith, 1992). Également, la croissance en milieu riche permet à la cellule de démarrer des rondes de réplication supplémentaires avant la fin de la réplication du chromosome (Cooper & Helmstetter, 1968). Ainsi, une cellule peut générer 2<sup>n</sup> chromosomes (où n représente le nombre d'origines). Le signal perçu par la cellule pour démarrer une ronde d'initiation est possiblement variable selon les conditions de croissance (Wang & Levin, 2009), mais le principal mécanisme serait que l'atteinte de la masse d'initiation déclenche la réplication (Donachie, 1968) ce qui se traduirait, par exemple, en une quantité suffisante de DnaA atteinte. Toutefois, certaines observations indiquent que la masse nécessaire pourrait varier lorsque la croissance est ralentie (Wold *et al.*, 1994). Un facteur expliquant la variation de la masse d'initiation est que les fourches de réplication doivent avoir voyagé une distance minimale avant qu'une prochaine ronde ne puisse débuter (Zaritsky *et al.*, 2007). Une autre possibilité serait que la dernière division permette la prochaine initiation de réplication (Bates & Kleckner, 2005). Toutefois, ce modèle ne concorde pas avec le

fait qu'on puisse abolir la division cellulaire sans empêcher la réplication (Cooper, 2006).

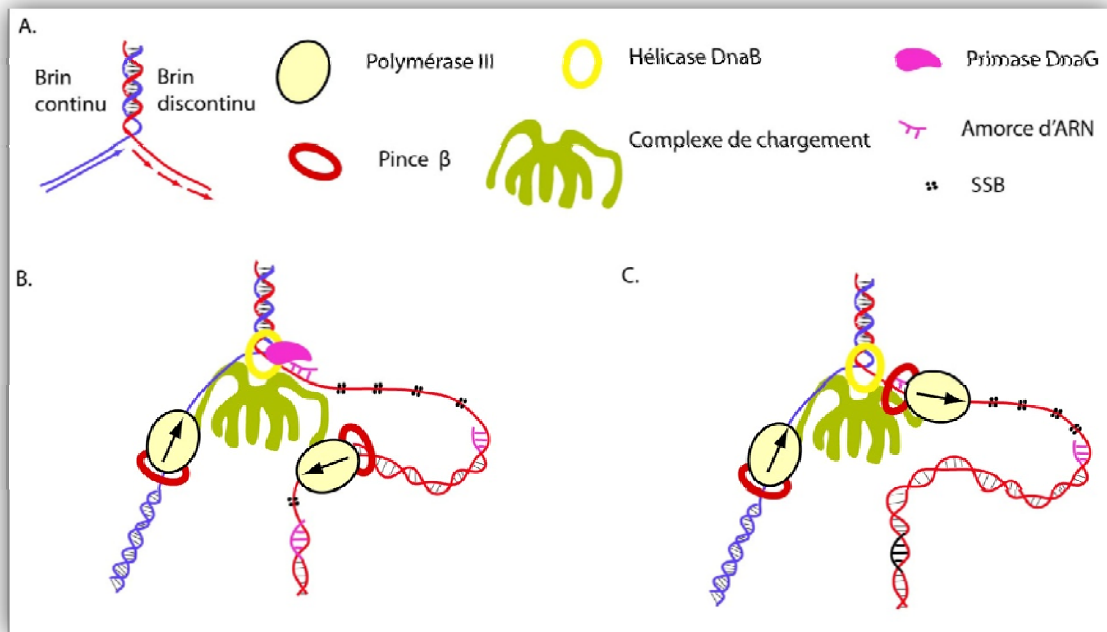
### 1.3.1.2 Élongation

La liaison de DnaA à *oriC* et l'ouverture subséquente du duplex assureront le recrutement de l'hélicase DnaB (*dnaB*) en collaboration avec DnaC (*dnaC*). DnaB permettra à la fourche d'avancer en déroulant l'hélice devant elle. Deux réplisomes vont cheminer en direction opposée pour se rejoindre à mi-chemin. La réplication de l'ADN se produit de manière semi-conservative où un des deux brins parental servira de modèle à la production d'un nouveau brin d'ADN (Meselson & Stahl, 1958). Les nucléotides sont incorporés dans la direction 5'-3' à partir du brin complémentaire. C'est l'ADN polymérase III (*polC*) qui est responsable de la formation de la chaîne de nucléotides. Elle attache le phosphate d'un dNTP (désoxyribonucléoside triphosphate) au 3'C du sucre du prochain dNTP alors que les deux autres phosphates produisent l'énergie nécessaire à la réaction. Brièvement, *Escherichia coli* possède également trois autres ADN polymérases qui sont aptes à poursuivre la réplication en cas de dommage à l'ADN; II (*polB*), IV (*dinB*) et V (*umuC*, *umuD*) ainsi qu'une polymérase I (*polA*) utile aux fragments d'Okazaki (Rattray & Strathern, 2003).

La polymérase III est constituée de nombreuses sous-unités formant ensemble l'holoenzyme (Johnson & O'Donnell, 2005). Son noyau rassemble l'activité de polymérisation ( $\alpha$ , *dnaE* ou *polC*) et d'exonucléase ( $\epsilon$ , *dnaQ*) ainsi qu'une sous-unité qui stimule  $\epsilon$  ( $\theta$ , *holE*). Le noyau uni au complexe de chargement  $\gamma$  («  *$\gamma$  complex clamp loader* ») forment la Pol III\*. Le complexe de chargement  $\gamma$  comprend une activité ATPase, permet de nombreuses interactions et est composé de plusieurs sous-unités:  $\gamma$  (*dnaX*),  $\tau$  (*dnaX*),  $\delta$  (*holA*),  $\delta'$  (*holB*),  $\chi$  (*holC*) et  $\psi$  (*holD*). Le complexe utilise l'énergie de l'hydrolyse d'ATP pour fixer la pince  $\beta$  («  *$\beta$  clamp* » (*dnaN*)) à l'ADN. Cette pince a la forme d'un anneau autour de l'ADN et elle s'associe directement au noyau de la polymérase afin d'augmenter sa vitesse et sa processivité (Bloom, 2009). C'est lorsque la sous-unité  $\delta$  est liée à l'ATP qu'elle se lie à la pince  $\beta$  et ensemble, ils ont une grande affinité pour un fragment d'ADN possédant une

amorce (Naktinis *et al.*, 1995). La pince se referme suite à l'hydrolyse d'ATP et le complexe de chargement  $\gamma$  pourra ensuite être recyclé.

Pour que la réplication des deux brins d'ADN antiparallèles s'accomplisse en direction 5'-3', il y aura formation d'un brin continu et d'un brin discontinu (figure 6A). Pour le brin continu, la polymérase insère les nucléotides en direction 5'-3' de façon constante, en voyageant sur l'ADN avec l'aide de la pince  $\beta$  (figure 6B). Afin de synthétiser le second brin, au moins deux polymérases devront être recrutées par  $\tau$  (Kim *et al.*, 1996b). Cette sous-unité assure également le lien entre les polymérases et l'hélicase (Kim *et al.*, 1996a). Après avoir interagit avec l'hélicase (Tougu &



**Figure 6 Réplication de l'ADN.** **A.** Pour que la réaction de polymérisation se produise en direction 5'-3', un brin continu et un brin discontinu seront formés. **B.** Les polymérases avancent sur l'ADN à l'aide de la pince  $\beta$ . Pour le brin discontinu, la polymérase démarre sur une amorce d'ARN synthétisée par la primase. **C.** L'ADNsb est protégé par la liaison de SSB jusqu'à ce que la polymérase se lie à la prochaine amorce. Figure adaptée de (Johnson & O'Donnell, 2005) © *Annual Reviews*.

Marians, 1996), l'ARN polymérase dite « primase » (*dnaG*) insère une amorce d'ARN sur le brin discontinu afin de débiter la synthèse d'un fragment d'Okazaki. Guidée par le complexe de chargement  $\gamma$ , la pince  $\beta$  s'insère sur l'amorce afin de recruter l'ADN polymérase et d'entreprendre la synthèse d'un nouveau fragment (figure 6C). La polymérase ne peut débiter l'élongation sur de l'ADN simple brin

alors il sera nécessaire de synthétiser une amorce pour chaque fragment d'ADN copié. Considérant qu'il y a un retard de synthèse d'ADN sur le brin discontinu, l'ADNsb exposé est protégé par la liaison de nombreuses SSB « *single-stranded DNA binding protein* » (*ssb*). Les amorces d'ARN peuvent être dégradées en partie par la RNase HI (*rnhA*), mais surtout par l'activité exonucléase 5'-3' de la polymérase I (Ogawa & Okazaki, 1984) qui pourra également remplir l'espace laissé par l'amorce par les nucléotides appropriés. La ligase reliera tous les fragments d'Okazaki par un lien phosphodiester entre le 3'OH du fragment et le phosphate en 5' du prochain segment d'ADN.

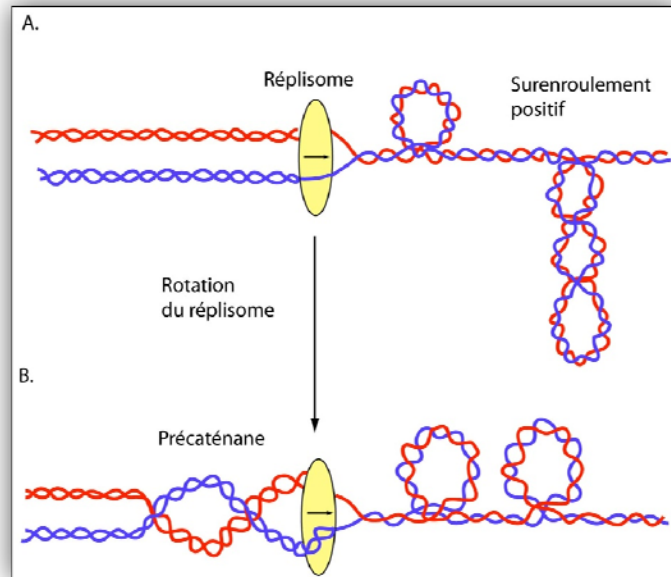
Tout comme l'étape de l'initiation était régulée selon la richesse du milieu, la durée nécessaire pour répliquer le chromosome (C) est également variable (Michelsen *et al.*, 2003). Les auteurs suggèrent que les dNTP disponibles ou l'énergie pourraient être les facteurs limitant en milieu pauvre. D'ailleurs, un lien entre l'activité inhibitrice du ppGpp sur la primase a été démontré chez *Bacillus subtilis* (Wang *et al.*, 2007). Chez *E. coli*, la pince  $\beta$  permet l'interaction de Hda qui stimule l'inactivation de DnaA. Le passage à la forme inactive de DnaA (DnaA-ADP) stimule la production des dNTPs par la réductase RNR (*rndAB*) (Gon *et al.*, 2006). Ainsi, la production des nucléotides est influencée par un membre du réplisome, ce qui suggère également une régulation selon la richesse du milieu.

L'avancement d'une fourche sur l'ADN crée de la tension devant elle. En effet, le déroulement de l'hélice par DnaB mène à l'accumulation de super-tours positifs (figure 7A). En assumant que le réplisome n'est pas fixe dans la cellule, une partie de la tension exercée sur l'ADN devant la fourche devrait également se redistribuer derrière la fourche par la rotation de la polymérase. Les deux brins d'ADN nouvellement répliqués vont ainsi s'enrouler sur eux-mêmes sous la forme de précaténanes (Peter *et al.*, 1998) (figure 7B). Une étude du mouvement des fourches de réplication par biopuces a déterminé que les deux topoisomérases de type IIA d'*E. coli* peuvent supporter l'élongation de la réplication (Khodursky *et al.*, 2000). Toutefois, ces résultats reposent sur l'utilisation d'antibiotiques pour inhiber les topoisomérases impliquées et ces conclusions ne semblent pas représenter la réalité *in*

*vivo* et ne concordent pas avec d'autres études (Espeli & Mariani, 2004). La gyrase enlève les super-tours positifs devant la fourche tandis que la topoisomérase IV préférerait agir derrière la fourche en enlevant les précaténanes (Hiasa & Mariani, 1996, Nurse *et al.*, 2003). Considérant que

seulement 1% des super-tours migreraient derrière la fourche sous forme de précaténanes et que le reste des super-tours sont enlevés par la gyrase, il est peu probable que la topoisomérase IV ait un rôle déterminant au niveau de la progression de la fourche (Wang *et al.*, 2008). D'ailleurs, ce groupe a également démontré que l'inhibition de la topoisomérase IV n'empêche pas la progression normale de la réplication (Wang *et al.*, 2008).

Il a été illustré que, *in vitro*, la topoisomérase III peut permettre la progression de la fourche (Hiasa & Mariani, 1994). Également, la surproduction de *topB* parvient à assurer la ségrégation en remplacement d'une topo IV inactive (Nurse *et al.*, 2003). Puisqu'une topoisomérase de type IA ne peut pas introduire de surenroulement négatif, la topoisomérase III pourrait agir derrière la fourche au niveau des précaténanes. Tel que mentionné précédemment, la topo III nécessite de l'ADN simple brin pour son action. Or, de l'ADNsb se retrouve tout juste derrière la fourche et aux fragments d'Okazaki ou alors une hélicase pourrait lui fournir son substrat. Dans ce cas-ci, l'hélicase RecQ n'est pas nécessaire puisqu'elle peut être enlevée sans effet sur la correction (Nurse *et al.*, 2003). La seconde topoisomérase de type IA d'*E.*



**Figure 7 Formation de précaténanes lors de la réplication.** **A.** Du surenroulement positif s'accumule devant la fourche de réplication. **B.** Par la rotation du réplisome, une portion des super-tours migrent derrière la fourche sous forme de précaténanes. Le réplisome est représenté de manière simplifiée. Se référer au texte pour les détails supplémentaires. Figure adaptée avec permission de *Macmillan Publishers Ltd* de (Wang, 2002).

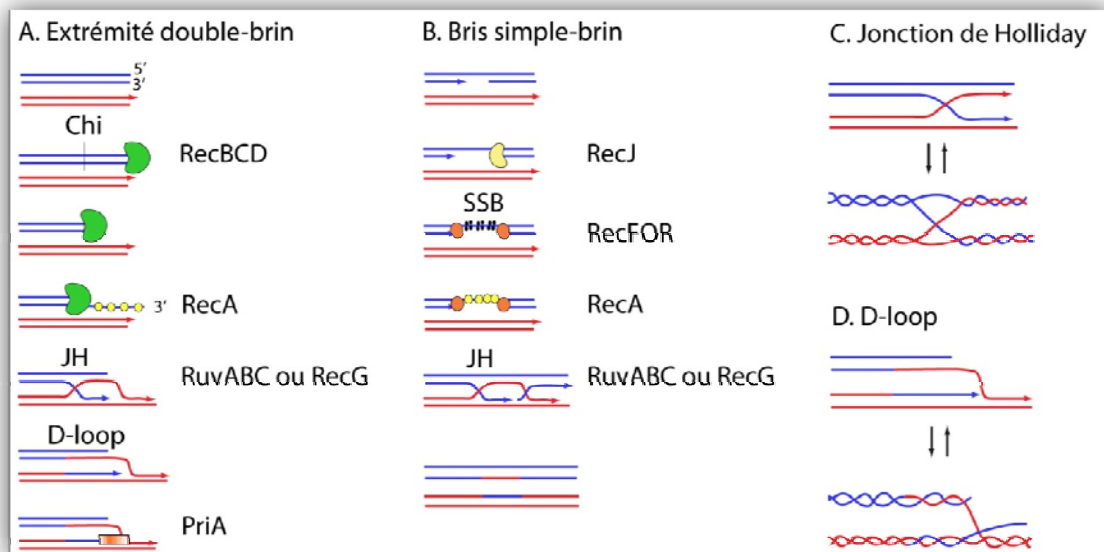
*coli*, la topo I, ne supporte pas l'élongation de la réplication (Hiasa & Marians, 1994). Il est nécessaire pour la cellule d'éliminer les contraintes à la progression de la fourche et donc une topoisomérase est essentielle à l'élongation de la réplication. Tous les liens entre les deux molécules d'ADN devront éventuellement être retirés à la fin de la réplication, et le cas particulier de la terminaison sera abordé dans la prochaine section.

Certaines structures rencontrées par la polymérase peuvent arrêter la progression de la fourche de réplication et elles sont généralement associées avec l'activation de la réponse SOS. En effet, la réponse SOS peut avoir des origines aussi variées qu'une lésion causée par un agent chimique, une fourche de réplication bloquée par un dommage endogène à l'ADN ou un membre du replisome inactif et même une topoisomérase inhibée laissera derrière elle des bris dans l'ADN (O'Reilly & Kreuzer, 2004). Stimulé par l'ADNsb exposé suivant la lésion, RecA (*recA*) stimule l'autoclivage de RecA, ce qui active le clivage du répresseur LexA (*lexA*) et permet l'expression du régulon SOS (Giese *et al.*, 2008). Parmi les nombreux gènes activés, les polymérases II, IV et V peuvent remplacer la polymérase III et poursuivre la réplication malgré ces lésions. Toutefois, ces polymérases sont peu processives et sont la source de mutations; c'est pourquoi leur niveau demeure bas en dehors de la réponse SOS (Foster, 2007).

Le dommage à l'ADN pourra être corrigé ultérieurement à l'aide d'un système de réparation, par exemple la réparation des mésappariements (« *mismatch repair* ») (Li, 2008), ou alors au moment du redémarrage de la fourche. Les causes de l'arrêt étant variées, de nombreux mécanismes sont impliqués dans la reprise de la réplication. Ainsi, la structure résultante de l'arrêt de la fourche pourra être résolue par des hélicases ou alors par des protéines de recombinaison. Dans ce second cas, un bris double brin dans l'ADN (adjacent ou non à une jonction de Holliday (JH)) peut mener respectivement, à l'inversion (« *reversal* ») ou à l'affaissement (« *collapse* ») de la fourche (Michel *et al.*, 2007). L'inversion de la fourche forme une structure déroulée de quatre brins et elle peut être causée, par exemple, par une accumulation de surenroulement positif devant la fourche. Le mécanisme d'inversion assure la



complétion de la réplication, évitant ainsi des conséquences aux générations futures (Atkinson & McGlynn, 2009). Dans ces cas, l'extrémité double brin est dégradée jusqu'à un site chi par RecBCD (*recBCD*) qui recrute également RecA (figure 8A). RecA crée un échange de brin et forme une jonction de Holliday qui est résolue par RuvABC (*ruvABC*). L'hélicase RecG (*recG*) peut être utilisée comme une alternative pour résoudre les jonctions de Holliday (figure 8A, C). Dans ce cas-ci, la jonction de Holliday est adjacente à un D-loop, soit une structure d'ADN à trois brins où le troisième brin s'apparie avec un duplex d'ADN, déplaçant ainsi un des brins du duplex (Michel *et al.*, 2007) (figure 8A, D). Ce D-loop produit par recombinaison permet la liaison de PriA (*priA*). PriA est une hélicase assurant le démarrage de la réplication ailleurs qu'à *oriC* et elle peut également reconnaître directement les fourches immobilisées (Marians, 2000). Une lésion sur l'ADN qui n'occasionne pas d'extrémité d'ADNdb causera la régression de la fourche; c'est le système RecFOR (*recFOR*) qui se lie à l'ADNsb et permet la liaison de RecA et la formation subséquente de jonctions de Holliday (Michel *et al.*, 2007) (figure 8B). RecJ (*recJ*) peut agir préalablement à la liaison de RecFOR afin d'élargir la portion d'ADNsb et



**Figure 8 Réparation par recombinaison homologue.** **A.** Voie utilisée par RecBCD en présence d'une extrémité double-brin. **B.** Voie utilisée par RecFOR en présence d'un bris simple-brin. **C.** Détails de la structure d'une jonction de Holliday (JH). **D.** Détails de la structure d'un D-loop. Figure adaptée avec permission d'*Elsevier* de (Michel *et al.*, 2007).

des molécules de SSB seront liées à l'ADNsb avant la liaison de RecA.

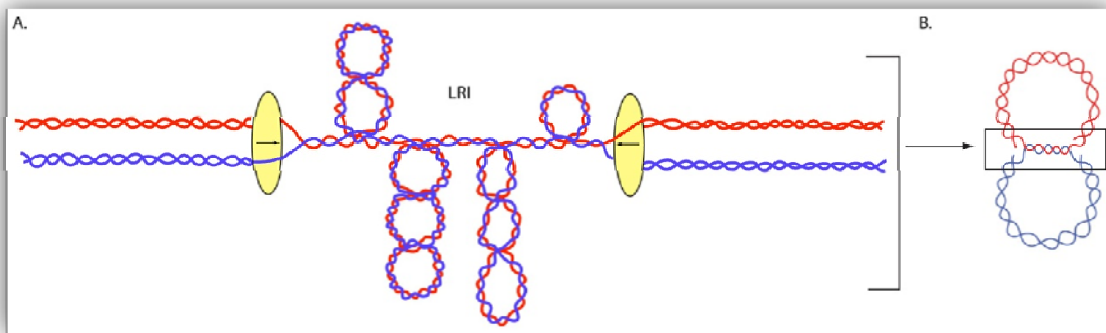
Suivant sa liaison, PriA recrute les autres membres du primosome, soit PriB (*priB*), DnaT (*dnaT*), l'hélicase DnaB, DnaC et la primase DnaG. PriC (*priC*) pourrait aussi permettre le redémarrage de la fourche de façon directe (sans implication de la recombinaison) en agissant aux fourches immobilisées contenant une brèche dans le brin continu (Heller & Marians, 2006). Deux autres hélicases, Rep (*rep*) et UvrD (*uvrD*) sont associées à plusieurs niveaux de la reprise de la réplication. Rep peut déplacer les protéines bloquant la fourche ainsi qu'être recrutée avec PriC (Heller & Marians, 2007). UvrD interagit avec la polymérase III et pourrait donc aider à la progression de la réplication et elle inhibe également RecA pour empêcher la recombinaison lorsqu'elle n'est pas nécessaire (Heller & Marians, 2007). De plus, il est probable que les rôles de ces hélicases se chevauchent et permettent à l'hélicase principale DnaB d'assumer le reste de la réplication.

### 1.3.1.3 Terminaison

La progression bidirectionnelle des fourches de réplication se poursuit jusqu'à la rencontre des fourches dans la région *Ter*. Cette région est composée de dix sites *Ter* chez *E. coli*, dont *TerJ*, *TerG*, *TerF*, *TerB* et *TerC* (dans l'ordre rencontré pour une fourche s'éloignant d'*oriC* dans le sens anti-horaire) qui bloquent les fourches arrivant en sens horaire et *TerH*, *TerI*, *TerE*, *TerD* et *TerA* (dans l'ordre rencontré pour une fourche s'éloignant d'*oriC* dans le sens horaire) qui bloquent les fourches anti-horaires (Duggin *et al.*, 2008). La protéine Tus (*tus*) se lie asymétriquement aux sites *Ter*. La polarité de l'arrêt est expliquée par un modèle (Kaplan & Bastia, 2009) où l'hélicase DnaB écarte Tus lorsqu'elle arrive du côté dit permissif, mais elle est inhibée par son passage du côté non-permissif. Ce blocage pourrait être expliqué en partie par le déroulement du résidu C6 de *Ter* lors de l'arrivée de la fourche du côté non-permissif; Tus s'attache plus solidement lorsque cette portion C6 est déplacée. Les auteurs proposent que ce déroulement du site *Ter* ne soit qu'un mécanisme secondaire utilisé lorsque la liaison de DnaB au complexe Tus-*Ter* n'a pas été suffisante pour arrêter la fourche. Néanmoins, la terminaison aux sites *Ter* est facultative et une simple délétion de Tus est sans conséquences pour la cellule. Les bénéfices d'une terminaison au site *Ter* sont variés (Duggin *et al.*, 2008), entre autre cela empêche aux fourches de poursuivre leur chemin et de collisionner avec la

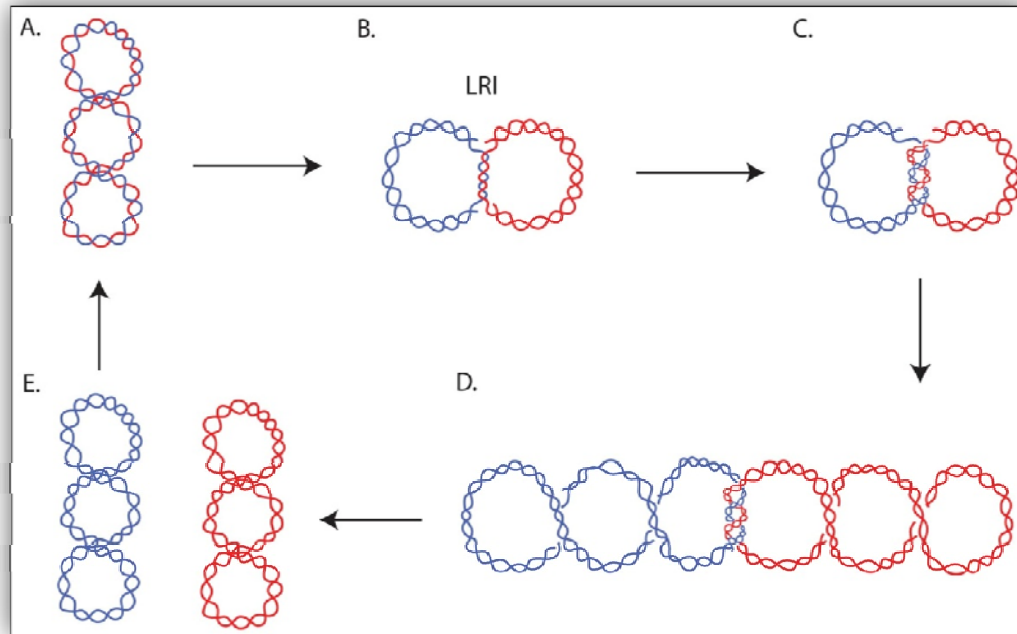
transcription, de même que cela prévient la sur-réplication. Enfin, après le démantèlement du réplisome, la polymérase I doit succéder à la polymérase III afin de compléter les segments d'ADN non-répliqués et ce rôle serait justement médié par l'interaction entre la polymérase I et Tus (Markovitz, 2005).

La progression des fourches jusqu'aux sites *Ter* a nécessité que les topoisomérases relâchent la tension devant ou derrière les fourches. À la fin de la réplication, les deux fourches convergent l'une vers l'autre, créant une accumulation de surenroulement positif entre les fourches (figure 9). L'espace restreint n'est pas



**Figure 9 Formation d'un intermédiaire de réplication tardif.** A. Du surenroulement positif s'accumule dans l'espace restreint entre les deux fourches convergentes. Les deux réplisomes sont représentés de manière simplifiée. B. Autre représentation d'un intermédiaire de réplication tardif (LRI). Se référer au texte pour des détails supplémentaires.

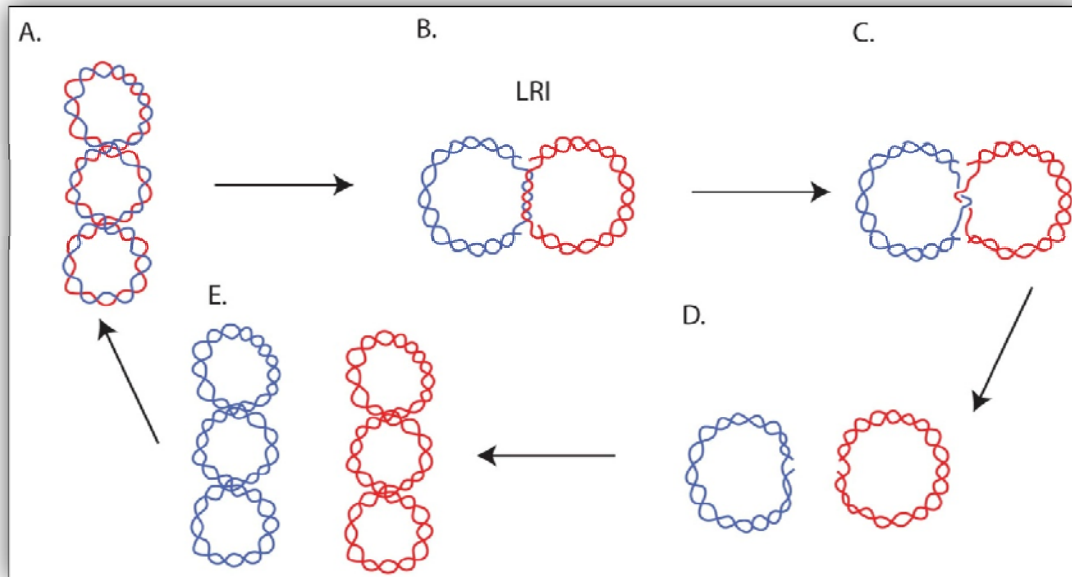
idéal pour l'action de la gyrase, mais cette structure doit absolument être résolue pour permettre la ségrégation des chromosomes. La résolution d'intermédiaires de réplication tardifs (LRI « *late replication intermediate* ») peut se faire selon deux voies (Minden & Marians, 1986, Wang, 1991). D'une part, la réplication peut se poursuivre sans que tous les liens entre les deux molécules ne soient enlevés (figure 10). Pour ce faire, la réplication se ferait uniquement sur le brin continu (figure 10C), les précaténanes devenant donc des caténanes, et le brin discontinu sera complété par la suite (figure 10D). Cette situation se produirait majoritairement lorsque la progression de la réplication est plus rapide que le déroulement de l'ADN. Il faudra alors l'action d'une topoisomérase de type II pour séparer les chromosomes enchaînés (figure 10E). La topoisomérase IV est l'enzyme assurant principalement la décaténation (Adams *et al.*, 1992, Peng & Marians, 1993a).



**Figure 10. Résolution d'intermédiaires de réplication tardifs par les topoisomérases de type IIA.** **A.** Chromosome surenroulé. **B.** Des intermédiaires de réplications tardifs (LRI) sont formés. **C.** La réplication se poursuit sur le brin continu uniquement. **D.** Complétion de la réplication sur le brin discontinu et formation de caténanes. **E.** Décaténation par une topoisomérase de type IIA. Se référer au texte pour les détails supplémentaires. Figure adaptée de (Minden & Marians, 1986) © *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*.

D'autre part, il est possible que l'ADN soit déroulé au fur et à mesure qu'il est copié et les deux chromosomes seront donc séparés au moment de la complétion de la réplication (figure 11). Cette voie implique que la réplication soit moins rapide et des topoisomérases de type IA pourraient agir en cette occasion (Minden & Marians, 1986, Wang, 1991). Un groupe a d'ailleurs observé une accumulation de LRI *in vivo*, lorsqu'une topoisomérase de type IA spécifique à la mitochondrie des trypanosomes (topo IA<sub>mt</sub>) est inactivée (ScoCCA & Shapiro, 2008). Dans ce cas, l'implication de ces topoisomérases dans la résolution de fourches convergentes est directement démontrée.

Également, un système *in vitro* de fourches convergentes illustre que la structure LRI formée est résolue par la topoisomérase III (Suski & Marians, 2008). Dans ce système, l'ADNsb est fourni par l'activité de déroulement de l'hélicase RecQ (*recQ*) et aucune autre hélicase ne peut substituer à RecQ. La coopération entre RecQ et la topoisomérase III est bien caractérisée chez d'autres organismes, particulièrement



**Figure 11 Résolution d'intermédiaires de réplication tardifs par les topoisomères de type IA.** A. Chromosome surenroulé. B. Des intermédiaires de réplications tardifs (LRI) sont formés). C. séparation des duplex au fur et à mesure de la réplication. D. les chromosomes sont séparés avant la complétion de la réplication. E. La réplication est complétée. Se référer au texte pour les détails supplémentaires. Figure adaptée de (Minden & Marians, 1986) © American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

chez les eucaryotes au niveau du maintien de l'intégrité génomique (Mankouri & Hickson, 2007). La résolution des LRI par la topo III et RecQ est aussi dépendante de SSB, probablement pour assurer leur interaction (Suski & Marians, 2008). Il est également intéressant de penser que ce mode d'action à la fin de la réplication pourrait offrir l'opportunité à la polymérase I de se lier afin de compléter les derniers nucléotides (Duggin *et al.*, 2008).

Toutefois, il est peu probable que la voie utilisant la topoisomérase III pour résoudre les LRI soit la principale. D'abord, la topoisomérase III est une enzyme peu abondante avec approximativement de une à dix copies par cellule (DiGate & Marians, 1988). Ensuite, cette topoisomérase de type IA n'est pas essentielle à la viabilité d'une souche (DiGate & Marians, 1988). L'absence de cette enzyme cause donc très peu de phénotypes à part un niveau de mutagenèse plus élevé causé par un niveau accru de délétions de séquences répétées directes (Schofield *et al.*, 1992, Uematsu *et al.*, 1997). Ainsi, lorsque la topo III est utilisée pour corriger un phénotype *in vivo*, cette enzyme doit souvent être surproduite (Broccoli *et al.*, 2000,

Nurse *et al.*, 2003, Usongo *et al.*, 2008). Pareillement, il est démontré *in vitro* que la topoisomérase III peut effectuer l'action de décaténation (DiGate & Marians, 1988): considérant sa faible abondance, ce rôle n'est probablement pas pertinent *in vivo*. La topo III peut donc avoir de nombreux rôles selon les circonstances, mais la fonction principale de cette enzyme dans une cellule demeure une source de débat.

La voie menant à la caténation des chromosomes est donc probablement la voie principale lorsque les topoisomérases de type II ne sont pas sur-utilisées. Cette voie implique que la topoisomérase IV puisse séparer les chromosomes à la fin du cycle. Or, il est fort probable que la topoisomérase IV ne soit pas toujours disponible dans la cellule. L'enzyme est active sous sa forme hétéro-tétramérique et ses deux sous-unités co-localisent majoritairement à la fin de la réplication (Espeli *et al.*, 2003b). En effet, alors que ParE semble se retrouver aléatoirement dans la cellule, ParC est associé à la machinerie de réplication. C'est suite à la fin de la réplication que ParC est libre de se lier à ParE. Bien que cela n'exclue pas que la topo IV puisse agir à tout moment dans le cycle cellulaire, son activité serait concentrée avant la division afin d'assurer de séparer les molécules lors des bonnes circonstances. De plus, par sa sous-unité ParC, la topoisomérase IV s'associe avec le membre du divisome FtsK (*ftsK*) et ce partenariat stimule son activité de décaténation (Espeli *et al.*, 2003a). Conséquemment, la cellule peut canaliser l'activité de décaténation au centre de la cellule, soit l'endroit où il serait le plus crucial d'avoir des chromosomes bien séparés avant la division dans le cas d'une cellule en croissance rapide et possédant plusieurs chromosomes répliqués (Espeli *et al.*, 2003b).

Lorsqu'un segment du chromosome est répliqué, il est possible d'observer que cette portion dupliquée du chromosome demeure liée un certain temps avant la séparation nécessaire à la migration à leur pôle respectif. La cohésion des chromosomes pourrait être expliquée par la formation de précaténanes suite à la réplication et, dans ce cas, la topoisomérase IV serait responsable de contrôler la capacité de migration des nouveaux chromosomes (Wang *et al.*, 2008). Toutefois, il n'est toujours pas établi quel mécanisme compose la force amenant les chromosomes aux extrémités de la cellule, bien que plusieurs hypothèses soient proposées. Puisqu'il

semble que la ségrégation des chromosomes soit entamée tout de suite après le début de la réplication, il est probable que le passage de l'ADN dans le complexe de réplication soit impliqué dans la partition, à condition que la machinerie de réplication soit stable au centre de la cellule (Lemon & Grossman, 2001). Dans le modèle d'extrusion et de capture, après l'initiation de la réplication, la région entourant *oriC* nouvellement répliquée est repoussée vers les extrémités par l'énergie contenue dans le mouvement de l'ADN passant dans la polymérase. L'ADN serait ensuite attrapé par des composants membranaires afin de guider le chromosome au pôle. Toutefois, le suivi de la progression des réplisomes par des fusions fluorescentes rend peu probable l'attachement de la polymérase à la cellule (Reyes-Lamothe *et al.*, 2008).

Au niveau de la régulation de l'initiation, SeqA contribuait en séquestrant l'ADN hémi-méthylé surreprésenté dans la région d'*oriC*. Puisque des sites de liaison se retrouvent également un peu partout sur le chromosome, il est également possible que cette protéine reliée à la membrane cellulaire guide l'ADN nouvellement répliqué vers les pôles (Brendler *et al.*, 2000). Plus récemment, l'organisation du chromosome sous forme de macro-domaine ainsi que le fait que ceux-ci maintiennent une localisation précise permet de suggérer que la partition se fait pour chacun des quatre domaines (Espeli & Boccard, 2006). Dans le cadre du modèle d'extrusion et de capture, il est envisageable que, suite à sa réplication, un composant du macro-domaine se positionne et qu'ensuite, le reste du domaine vienne s'organiser autour.

La ségrégation des chromosomes est aidée par la condensation de celui-ci. En fait, une simulation informatique a déterminé que l'énergie contenue dans la compaction du chromosome serait suffisante pour leur séparation (Jun & Mulder, 2006). Spontanément, les chromosomes condensés vont se repousser. Il n'est donc pas surprenant que les enzymes impliquées dans l'organisation de l'ADN le soient aussi dans la ségrégation. Les niveaux de SetB (*setB*) sont importants pour la structure du chromosome qui sera affectée par sa délétion ou sa surexpression (Espeli *et al.*, 2003c). Sans SetB, les nucléoïdes demeurent attachés plus longtemps, car leur migration est ralentie. SetB interagit avec MreB (*mreB*), une protéine semblable à

l'actine. Justement, il est proposé que MreB participe à la ségrégation de l'ADN par son interaction avec la topoisomérase IV (Madabhushi & Mariani, 2009).

### 1.3.2 Division cellulaire

Suite à la duplication du chromosome et à la migration des cellules-filles aux pôles de la cellule, la bactérie peut enfin se diviser. L'étape-clé de la division est la formation de l'anneau-Z par la polymérisation GTP-dépendante de FtsZ (Harry, 2001). La contraction de l'anneau-Z guidera la division. Les facteurs déterminant le début de la division ne sont pas très bien connus, mais ils doivent prendre en compte le taux de croissance afin d'assurer que chaque cellule-fille reçoive un chromosome suite à la division. Il est possible que le niveau d'une protéine, FtsZ par exemple, soit atteint au moment de la division ou alors, plus généralement, une étape de la réplication pourrait permettre la division (Wang & Levin, 2009).

Bien que FtsZ soit la première protéine Fts (« *filamentous temperature sensitive* ») présente au site de division, le processus requiert de nombreuses autres protéines interagissant entre elles (Vicente *et al.*, 2006). La formation de l'anneau-Z est dépendante des protéines liées à la membrane FtsA ou ZipA, probablement pour stabiliser FtsZ à la membrane. ZapA facilite cette réaction. Puis, FtsE et FtsX sont des facteurs nécessaires à l'arrivée des prochains membres du complexe de division. FtsK est essentielle à la division et sa localisation avec l'anneau-Z convient bien à ses autres rôles. Tel que précisé auparavant, FtsK permet la ségrégation des chromosomes en assurant la décaténation par la topo IV (Espeli *et al.*, 2003a) et elle a même un rôle dans la résolution des dimères de chromosomes qui sera abordé ultérieurement (Aussel *et al.*, 2002). Lorsque la cellule se divise, elle ne fait pas que couper en son centre; il est crucial que la barrière avec l'environnement soit maintenue. FtsI et FtsW vont donc aider à la synthèse du peptidoglycane lors de la division. Le montage est complété par FtsN, AmiC et EnvC.

Ainsi, l'assemblage du septum de division nécessite l'interaction de nombreux membres, mais il est tout aussi important que la cellule s'assure d'avoir choisi le bon site de division. L'observation que la division se produise rarement en coupant un nucléoïde en deux a mené au modèle de l'occlusion du nucléoïde. La protéine



effectrice a été identifiée récemment (Bernhardt & de Boer, 2005), mais son mode d'action n'est toutefois pas précisé. SlmA peut se lier à FtsZ et pourrait agir soit en entrant en compétition avec des facteurs tels que FtsA et ZipA ou alors elle pourrait médier la dépolymérisation de FtsZ. Le système Min est quant à lui beaucoup mieux étudié. Le complexe MinCDE inhibe la division cellulaire et puisque ces composants oscillent d'un pôle à l'autre de la cellule, un gradient est créé et permet la division vers le centre de la cellule (Bramkamp & van Baarle, 2009). Plus précisément, c'est MinC qui possède l'action inhibitrice sur FtsZ et elle est recrutée aux pôles par l'ATPase MinD. MinD est reliée à la membrane lorsqu'elle est liée à l'ATP. Le mouvement d'oscillation est maintenu par MinE qui incite MinD à hydrolyser son ATP et, conséquemment, MinCD n'est plus lié à la membrane et migrera à l'opposé de MinE, soit au pôle opposé.

### **1.3.3 Autres activités sur l'ADN**

La réplication est majoritairement responsable des tensions générées dans l'ADN puisqu'inévitablement, l'avancement de la fourche demande la séparation de la double hélice. Toutefois, d'autres processus, notamment la transcription, sont en cours simultanément et doivent être évités par la fourche de réplication. Lorsque les obstacles ne sont pas esquivés, la cellule corrige la situation par recombinaison, mais il ne faut pas oublier que la recombinaison nécessite un échange de brins entre deux molécules d'ADN et que cela peut également être un obstacle pour la ségrégation.

#### **1.3.3.1 Transcription sur l'ADN**

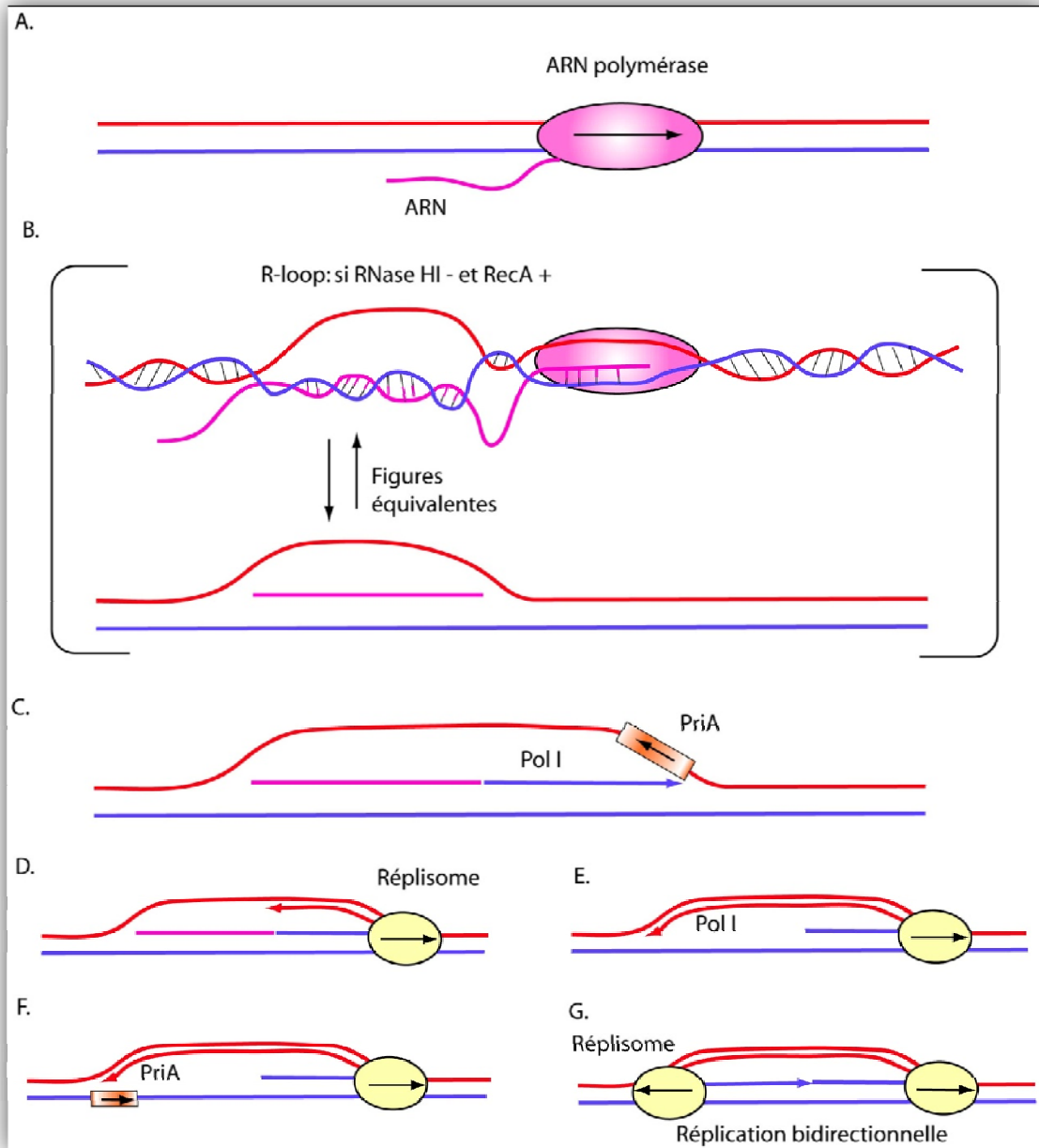
La transcription se produit simultanément à la réplication. La cellule doit donc éviter des collisions entre ces diverses machineries voyageant sur l'ADN. En ce sens, les sites *Ter* évitent la progression des fourches dans la direction préférée de la transcription (Duggin *et al.*, 2008). La cellule possède de nombreux systèmes pour réparer prioritairement l'ADN transcrit pour ne pas bloquer les ARN polymérases (Rudolph *et al.*, 2007). Malgré tout, considérant l'abondance des ARN polymérases, des collisions avec la réplication peuvent se produire et alors la lésion devra être réparée.

Également, la transcription cause un changement local de surenroulement qui doit être contrôlé pour permettre la progression des activités sur l'ADN. En effet, selon le « *twin-supercoiled-domain model* » (Liu & Wang, 1987) lorsque le complexe de transcription est fixe, du surenroulement positif s'accumule devant l'ARN polymérase et des super-tours négatifs derrière. La gyrase ainsi que la topoisomérase I pourront chacune agir devant et derrière la fourche respectivement pour maintenir le surenroulement sous contrôle. La paire composée des deux topoisomérases aux actions opposées (la topo I et la gyrase) est également parfaitement adaptée pour contrôler le niveau de surenroulement du chromosome (Wang, 1991, Zechiedrich *et al.*, 2000). Par sa structure particulière, la gyrase est la seule topoisomérase de type IIA à insérer des super-tours négatifs dans l'ADN tandis que la topo I parvient à efficacement relaxer l'ADN. D'ailleurs, l'action de la topo I pour contrebalancer la gyrase a été proposée suite à l'observation que l'inactivation de *topA* s'accompagne d'une forte pression sélective pour des mutations réduisant l'activité de la gyrase (DiNardo *et al.*, 1983).

Nous savons maintenant qu'il est possible d'enlever la topoisomérase I sans la présence de mutations compensatoires dans la gyrase, mais la réaction doit se faire à de hautes températures, car les mutants *topA* sont sensibles au froid (Massé & Drolet, 1999). Il est possible, par exemple, qu'une baisse de température favorise la formation de R-loops, ce qui peut devenir problématique pour une souche *topA* (Massé & Drolet, 1999). En effet, l'importance pour la cellule de contrôler le surenroulement associé à la transcription peut être appréciée en l'absence de topoisomérase I: l'hyper-surenroulement négatif formé est associé à la création de R-loops et cause l'inhibition de la croissance (Drolet, 2006). Un rôle de la topoisomérase I est donc de contrôler la formation de R-loops et, à l'inverse, l'inhibition de la formation de R-loops corrige en partie un mutant *topA* (Drolet *et al.*, 1995).

Un R-loop est formé lorsque l'ARN naissant se réapparie avec le brin matrice d'ADN. Les R-loops peuvent alors servir d'origines de réplication supplémentaires par un mécanisme nommé cSDR (« *constitutive stable DNA replication* ») (Kogoma,

1997) (figure 12). La réplication par cSDR est indépendante de DnaA pour l'initiation à *oriK*. Il est donc possible d'enlever la région *oriC* et le gène *dnaA* dans une souche qui est dépendante du cSDR (Kogoma & von Meyenburg, 1983). C'est la formation du R-loop qui ouvre le duplex d'ADN (figure 12A-B) et permet le démarrage de la réplication à un site alternatif à *oriC*. Les R-loops sont normalement rapidement dégradés par la RNase HI, mais cette structure sera stable dans un mutant *rnhA*. La RNase HI a donc comme rôle la prévention d'une initiation à des sites autres qu'*oriC* (Kogoma, 1997). L'initiation de la réplication par cSDR nécessite également les fonctions de recombinaison de RecA (Kogoma *et al.*, 1994). L'amorce sera synthétisée par la polymérase I à partir du fragment d'ARN (Kogoma & Maldonado, 1997) (figure 12C). Ensuite, le système de redémarrage de la fourche sera entamé par PriA et un nouveau primosome composé de la polymérase III poursuivra la réplication (Kogoma, 1997) (figure 12C-G). Il est possible que ce mode de réplication soit utilisé en cas de stress. Dans certaines situations, il serait donc avantageux à *E. coli* de pouvoir répliquer certaines portions de son génome, mais chaque fourche supplémentaire voyageant sur l'ADN peut devenir une source de collision.



**Figure 12 Mécanisme de réplication bidirectionnelle à partir d'un R-loop par cSDR.** Suite à la transcription (A), l'ARN naissant peut s'hybrider avec l'ADN, ce qui déplace le deuxième brin du duplex et forme un R-loop (B). La polymérase I synthétise une amorce et permet la liaison de PriA pour le démarrage de la réplication (C). Le reste du réplisome peut alors poursuivre la réplication (D). Les mêmes étapes peuvent être répétées à l'autre extrémité du R-loop (E-G) afin de permettre une réplication bidirectionnelle. Se référer au texte pour les détails supplémentaires. Figure adaptée avec permission de *American Society for Microbiology* de (Kogoma, 1997).

Finalement, un autre lien entre la transcription et la réplication est que si l'ARN polymérase est reliée à la membrane (Cook, 1999), elle pourrait également servir de moteur à la ségrégation, tout comme le réplisome (Dworkin & Losick, 2002). Considérant que la localisation des gènes est hétérogène (Lopez & Philippe, 2001), c'est-à-dire que la majorité des gènes sont transcrits dans l'orientation opposée à *oriC*, la transcription pourrait fort bien être une force importante pour que l'ADN nouvellement répliqué près d'*oriC* migre vers les pôles (Dworkin & Losick, 2002).

### 1.3.3.2 Recombinaison

La recombinaison homologue implique l'échange de brins entre deux molécules d'ADN. Tel qu'expliqué précédemment, la réparation des brèches dans l'ADN se fait souvent par recombinaison homologue où le brin intact sert de matrice à la synthèse du brin visé par la réparation. Avant que RecA ne puisse catalyser sa réaction d'échange de brins, la structure endommagée sera préparée par le système RecFOR ou RecBCD. Les jonctions de Holliday pourront ensuite être résolues par RuvABC ou RecG (Michel *et al.*, 2007). Dans tous les cas, la structure devra être résolue afin de permettre aux chromosomes de se séparer.

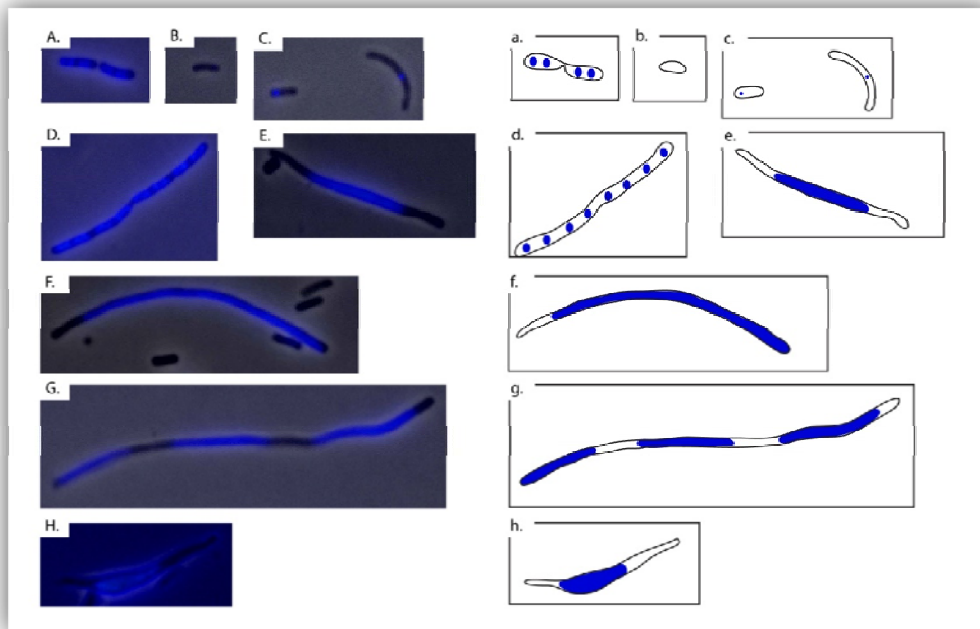
Les topoisomérases pourraient également être des acteurs importants dans la résolution des intermédiaires de recombinaison. Il est suggéré que les deux topoisomérases de type IA soient associées à la recombinaison chez *E. coli* et qu'au moins une des deux soit requise à la ségrégation (Zhu *et al.*, 2001). Ce rôle est inspiré du fait que les problèmes de ségrégation associés à la délétion des topoisomérases I et III sont corrigés par l'inactivation du membre principal de la recombinaison, RecA. Les rôles de topoisomérases de type IA associés à la recombinaison seront détaillés dans la section suivante.

Ainsi, la recombinaison homologue est un événement fréquent pour, entre autre, réparer les fourches endommagées. Lors de la recombinaison, s'il y a un échange de brin (« *crossing over* ») entre deux chromosomes, il en résultera un dimère de chromosomes (Sherratt *et al.*, 2004). Cette structure est différente des caténanes, puisque dans ce cas, les deux chromosomes font parti du même cercle. Cet assemblage pourra être résolu par la recombinaison site-spécifique. Les recombinases

site-spécifiques XerC (*xerC*) et XerD (*xerD*) vont chacune faire un échange de brin sur le site *dif* retrouvé sur chacun des chromosomes, dans la région *Ter*. Ce mécanisme est également dépendant de FtsK qui s'assure que la création de monomères soit coordonnée au site de la division en activant XerCD (Aussel *et al.*, 2002). Des rondes successives de recombinaison site-spécifique peuvent même résulter en la décaténation des chromosomes (Grainge *et al.*, 2007). Au fil des générations, les mutations s'accumulent majoritairement sur le brin continu et l'analyse informatique de ce biais mutationnel permet de suivre la progression des fourches. Suite à une telle étude, il a été suggéré que la terminaison se produirait plutôt au site *dif* qu'à la région *Ter* (Hendrickson & Lawrence, 2007), démontrant qu'il reste beaucoup à découvrir à propos des processus qui sont pourtant à la base de tout, telle la réplication.

#### 1.4 Les problèmes de ségrégation : causes et conséquences

Pour assurer une ségrégation impeccable des chromosomes, il est essentiel que les étapes détaillées précédemment se produisent toutes sans faille. Les principaux



**Figure 13. Problèmes de ségrégation.** Exemples de cellules dont l'ADN est coloré au DAPI (4', 6-diamidino-2-phénylindole) (A-H) et leur représentation schématique (a-h) (Tanguay C., résultats non-publiés). Cellule dont les chromosomes sont correctement ségrégés (A, a). Cellule anucléée (B, b) et à ADN dégradé (C, c). Inhibition de la division cellulaire; filamentation avec chromosomes bien séparés (D, d). Exemples de problèmes de ségrégation (E-H, e-h).

endroits où un mauvais fonctionnement entraîne un défaut de ségrégation de l'ADN seront détaillés avec les conséquences pour la cellule. La figure 13 illustre des exemples de phénotypes retrouvés lorsque la ségrégation ne se déroule pas correctement.

#### 1.4.1 Au niveau de l'organisation du chromosome

Les protéines associées au maintien de la structure du chromosome assurent à la fois sa condensation, son accessibilité et son organisation. Un défaut de fonctionnement dans une de ces protéines aura donc des conséquences sur de nombreux processus cellulaires, dont la séparation des chromosomes. Justement, MukB a été découvert en recherchant les gènes responsables de défauts de ségrégation (Niki *et al.*, 1991). Ainsi, MukBEF permet la compaction du chromosome et lorsque MukB est muté, des cellules anucléées sont formées (Niki *et al.*, 1991). Ces cellules sans ADN sont le résultat d'une ségrégation inégale des chromosomes.

Considérant l'importance pour une cellule d'assurer la condensation de son chromosome, plusieurs mécanismes coopèrent, dont le surenroulement négatif. En conséquence, la mauvaise ségrégation des mutants *mukB* est corrigée si le surenroulement est augmenté par des mutations dans la topoisomérase I (Sawitzke & Austin, 2000). À l'inverse, ces mutants *mukB* supportent difficilement l'inactivation de la gyrase par la novobiocine (Adachi & Hiraga, 2003). Cette collaboration entre le surenroulement et l'organisation du chromosome est fréquente, puisqu'une autre protéine organisant l'ADN, HU, est également plus sensible à la novobiocine (Malik *et al.*, 1996). Plus précisément, chez un mutant *mukB*, il a été démontré que la localisation des fourches de réplication est erronée (Adachi *et al.*, 2005) et que l'absence de MukB empêche le positionnement normal de la région entourant l'origine suite à sa réplication (Danilova *et al.*, 2007). Il est donc possible que l'action de MukB pour aider la ségrégation ne soit pas limitée à la compaction du chromosome et soit plus directe. Supportant cette idée, aucune correction par *topA* n'est obtenue sur l'emplacement de la région Ori nouvellement répliquée,

contrairement à l'effet observé sur son rôle pour la compaction de l'ADN (Danilova *et al.*, 2007).

Des observations semblables peuvent être faites avec H-NS; cette protéine abondante a des fonctions variées et des modifications dans son niveau d'expression ont des conséquences différentes (Atlung & Hansen, 2002). Une surexpression de H-NS crée des nucléoïdes trop condensés (Spurio *et al.*, 1992) alors que chez des mutants *hns*, la localisation des nucléoïdes est affectée et mène à la production de cellules anucléées (Kaidow *et al.*, 1995). L'homologue de l'actine MreB est responsable de la forme en bâtonnet de la cellule et lorsqu'une forme mutante de la protéine est utilisée, la ségrégation des nucléoïdes ne se déroule pas normalement (Kruse *et al.*, 2003). Les auteurs ont constaté une localisation aberrante des sites *oriC* et *terC*. Il a alors été suggéré que, semblablement à l'actine, MreB puisse être une force dirigeant les chromosomes au moment de la ségrégation. L'interaction de MreB avec l'ARN polymérase suggère également une coopération possible entre ces moteurs pour déplacer l'ADN (Kruse *et al.*, 2006). Toutefois, il est également probable que les problèmes de ségrégation soient causés par l'inhibition de la topoisomérase IV lorsque MreB n'est pas fonctionnel (Madabhushi & Mariani, 2009). Effectivement, MreB interagit avec ParC et la collaboration de ces protéines en fin de cycle permettrait de réguler les dernières étapes de la ségrégation avant la division cellulaire.

## **1.4.2 Au niveau de la réplication**

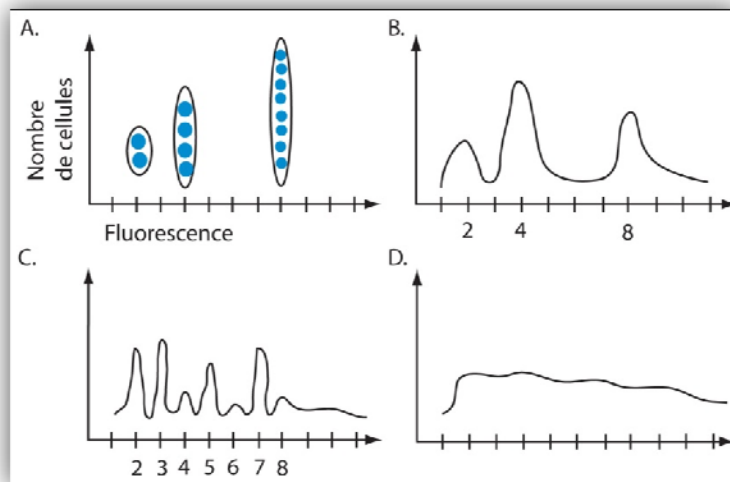
### **1.4.2.1 Asynchronisme du cycle cellulaire**

Alors que la compaction du chromosome par les protéines de liaison à l'ADN est un des moyens qui assure à la cellule la partition de ses nucléoïdes, ces protéines influencent également la synchronicité du cycle cellulaire. En pliant l'ADN, HU et IHF aident à l'ouverture du duplex à l'origine (Hwang & Kornberg, 1992). Dans cette optique, la mutations des sites de liaisons de IHF rendent l'initiation de la réplication asynchrone (Weigel *et al.*, 2001). Par cytométrie en flux, il est possible de mesurer la quantité d'ADN dans chaque cellule individuelle et c'est donc une technique répandue pour évaluer la synchronicité du cycle cellulaire. Toutes les cellules d'une



population synchrone auront un nombre de chromosome correspondant à  $2^n$ , selon le nombre d'origines actives ( $n$ ) initialement. Pour ce faire, deux conditions doivent être remplies: il faut prévenir l'initiation de nouvelles rondes de réplication ainsi que permettre la progression des fourches dont la réplication est entamée. Une réaction de transcription est nécessaire à *oriC* pour l'initiation de la réplication et donc l'ajout d'un inhibiteur de l'ARN polymérase comme la rifampicine est une méthode efficace pour empêcher l'initiation de la réplication (Skarstad *et al.*, 1986). La cytométrie en flux permettra ensuite de quantifier l'ADN préalablement coloré et, pour une population synchrone, les pics  $2^n$  seront observés (figure 14A-B). Des cellules asynchrones

pourraient soit se présenter avec des pics à des nombres de chromosomes différents de  $2^n$  (figure 14C) ou même par l'absence de pics définis si la



réplication n'est pas complétée (figure 14D). De nombreux mécanismes

**Figure 14 Mesure du synchronisme par cytométrie.** A. Un pic correspond à une population de cellules avec une quantité d'ADN semblable. B. Cycle cellulaire synchrone. C. Cycle asynchrone, réplication complétée. D. Cycle asynchrone, réplication incomplète. Se référer au texte pour les détails supplémentaires.

collaborent pour garantir le synchronisme cellulaire et ainsi éviter que le processus énergiquement coûteux qu'est la réplication ne démarre à des moments inopportuns. De plus, un dérèglement du cycle cellulaire causera une surcharge de travail au moment de la ségrégation.

La séquestration des sites hémi-méthylés suite à la réplication est un autre moyen de contrôle pour la cellule. La mutation des sites de méthylation près d'*oriC* cause une sur-initiation de la réplication, de même qu'une souche *seqA* est asynchrone (Bach & Skarstad, 2004). Les cellules résultantes de ces mutations possèdent souvent

trois nucléoïdes et le septum de division se forme de façon asymétrique, générant une cellule-fille à deux chromosomes et une autre à un seul chromosome (Bach & Skarstad, 2004).

La protéine initiateur DnaA est essentielle au bon fonctionnement de l'initiation et son inactivation rend le cycle cellulaire asynchrone (Skarstad *et al.*, 1986). IHF est nécessaire pour permettre le titrage des DnaA par les sites *datA* (Nozaki *et al.*, 2009) et ainsi éviter des rondes précoces d'initiation. Un niveau trop élevé de DnaA cause une sur-initiation de la réplication (Simmons *et al.*, 2004). À ce moment, les nombreuses fourches voyageant sur l'ADN entrent plus fréquemment en collision et ces structures devront être réparées. Les souches sur-exprimant DnaA sont donc dépendantes des mécanismes de redémarrage de la fourche, tels PriA et RecBCD (Simmons *et al.*, 2004). Au contraire, l'ajout de sites *datA* supplémentaires diminue la disponibilité des DnaA, ce qui retarde l'initiation (Morigen *et al.*, 2003). Le taux de progression de la fourche de réplication est alors perturbé et la cellule devient également dépendante des mécanismes de redémarrage de la fourche (PriA), la réponse SOS est déclenchée et RecA est indispensable (Morigen *et al.*, 2003). Les effets nombreux et différents des changements dans le niveau de DnaA démontrent l'importance de la protéine initiateur dans l'initiation de la réplication et, ultimement, l'importance pour la cellule de conserver son synchronisme.

Il est intéressant de noter que les défauts d'initiation d'un mutant DnaA thermosensible peuvent être corrigés par une mutation dans *topA* (Louarn *et al.*, 1984). Il a été proposé que l'absence de *topA* pouvait soit corriger par la modulation de l'expression de DnaA ou alors, moins de molécules de DnaA sont nécessaires pour l'initiation d'une souche *topA*. En effet, le niveau de surenroulement affecte la transcription de gènes variés (Peter *et al.*, 2004) et une mutation *topA* a donc de nombreuses conséquences indirectes. Toutefois, il a été démontré plus tard que l'effet du surenroulement sur la synchronie n'est pas causé par un changement dans le niveau de DnaA (von Freiesleben & Rasmussen, 1992). Le niveau de surenroulement modifie la topologie de la région *oriC*, et deux effets de la topo I sont possibles. L'augmentation de surenroulement négatif d'une souche *topA* peut d'abord lui-même

faciliter l'ouverture du duplex à *oriC* et également, DnaA a plus d'affinité pour l'ADN surenroulé négativement (von Freiesleben & Rasmussen, 1992). Le mutant *dnaA* peut être corrigé par l'ajout de NaCl concentré, ce qui augmente aussi le niveau de surenroulement (Kondo *et al.*, 2000).

La topoisomérase I n'est pas vraiment directement impliquée dans la réplication. Son rôle majeur est plutôt considéré comme une force pouvant contrebalancer la gyrase, ceci puisqu'historiquement, l'abolition de la topo I est accompagnée de mutations compensatoires dans la gyrase (DiNardo *et al.*, 1983). Le surenroulement négatif instauré par la gyrase est nécessaire afin de permettre l'ouverture des brins d'ADN à *oriC*. Par sa capacité à enlever des super-tours négatifs, la topo I pourrait aussi offrir un point de régulation de l'initiation de la réplication (Hiasa *et al.*, 1994). Un groupe a étudié l'asynchronie des mutants *seqA*, *dnaA* et *topA* (Olsson *et al.*, 2003). Ils ont constaté que la période entre deux rondes d'initiation est diminuée. Cette observation peut être expliquée par la meilleure accessibilité à l'ADN lorsqu'elle est surenroulée, comme c'est le cas dans un mutant pour la topoisomérase I.

Chez un mutant pour la RNase HI, une réplication indépendante de *oriC* (cSDR) peut démarrer à partir de R-loops stabilisés (Kogoma, 1997). Ces souches *rnhA* ont un cycle cellulaire asynchrone (Kogoma *et al.*, 1985). Un des rôles de la RNase HI est donc de prévenir l'initiation de la réplication à des sites illégitimes, assurant ainsi la synchronicité du cycle cellulaire. Ce type de réplication est effectivement beaucoup moins régulé que celui démarrant à *oriC*, étant indépendant de DnaA (Kogoma & von Meyenburg, 1983). D'un point de vue différent, il est possible de constater qu'une mutation *rnhA* permet la correction d'un mutant *dnaA*. Toutefois, le taux de croissance d'une telle souche est diminué, de même que le contenu en ADN de ces cellule (von Meyenburg *et al.*, 1987). La population devient alors très hétérogène, démontrant que l'initiation par cSDR est un mécanisme aléatoire. Les mutants *rnhA* expriment la réponse SOS de manière constitutive (Kogoma *et al.*, 1993). Ce mécanisme pourrait être induit directement par la reconnaissance de l'ADNsb de la structure du R-loop. Les R-loops présents peuvent également bloquer la progression

des fourches de réplication, causant ainsi l'affaissement des fourches et la réponse SOS pourrait donc aussi être induite indirectement (Kogoma, 1997). Ainsi, un nombre important de fourches voyageant sur l'ADN augmentera le risque de collision de fourches et subséquemment, la quantité de bris doubles brins dans l'ADN. Ces bris devront être réparés pour éviter qu'ils ne deviennent eux-mêmes des sources d'arrêt de fourche ou qu'ils n'occasionnent des réarrangements chromosomiques comme des délétions. Les bris doubles brins dans l'ADN activent la réponse SOS et cette situation pourrait mener à de l'hyper-recombinaison.

#### 1.4.2.2 Barrières à l'élongation

L'élongation de la réplication est également une étape-clé. Des obstacles à la réplication qui empêchent la progression de la fourche doivent être résolus pour compléter la réplication et puis permettre la partition des chromosomes. Un double mutant *gyrB priA* est létal, indiquant que l'assemblage du primosome par *priA* est essentiel pour pouvoir redémarrer la fourche de réplication dans ces mutants (Grompone *et al.*, 2003). Un obstacle à la progression de la fourche est donc présent chez ce mutant *gyrB*. Ce groupe a observé que la baisse du surenroulement par la gyrase n'est pas la cause de l'arrêt de la fourche, puisqu'une mutation *topA* ne permet pas la viabilité (Grompone *et al.*, 2003). Ainsi, c'est l'enlèvement des super-tours positifs par la gyrase qui permet l'avancement de la fourche et, sans la gyrase, la fourche s'affaisse et la cellule dépend de son redémarrage pour survivre.

Pareillement, chez un mutant dont la gyrase n'est que partiellement active (sous-unité GyrB thermosensible), le taux de synthèse d'ADN est diminué (Mirkin & Shmerling Zh, 1982, Filutowicz & Jonczyk, 1983, Drlica, 1984). Donc, même si la cellule peut survivre sans une gyrase complètement fonctionnelle, elle sera moins efficace pour assurer la progression de la réplication.

Tout comme une accumulation de surenroulement positif peut bloquer la progression d'une fourche, la convergence de deux fourches devient aussi une barrière. Tel qu'expliqué précédemment, lors de la terminaison de la réplication bidirectionnelle du chromosome, les deux fourches vont nécessairement converger à la région *Ter*, et la tension accumulée dans cet espace restreint forme ainsi des LRI

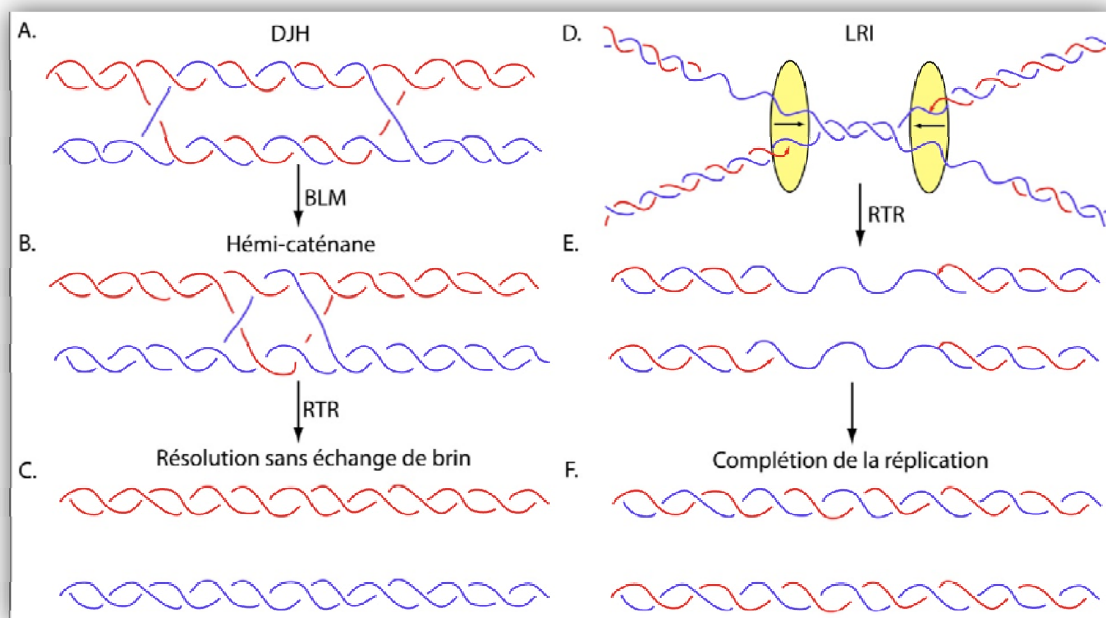
(figure 9). Dans le cas d'un cycle asynchrone, cette situation peut également survenir abondamment sur le chromosome par la présence de nombreuses fourches sur l'ADN. Dans une reproduction *in vitro*, des auteurs ont démontré que la topoisomérase III parvient à résoudre ces LRI, avec l'aide de RecQ et de SSB (Suski & Marians, 2008). Cette coopération est d'autant plus intéressante qu'aucune autre hélicase que RecQ ne pouvait catalyser cette réaction.

Les hélicases de la famille RecQ sont conservées chez de nombreux organismes. La superfamille SF2 comprend RecQ d'*E. coli*, Sgs1 de *Saccharomyces cerevisiae* ainsi que BLM, WRN et RECQ1, 4, 5 chez l'humain (Wu & Hickson, 2006). Une levure sans Sgs1 est plus sensible aux dommages chimiques et elle présente de l'hyper-recombinaison. Ses rôles connus comprennent la résolution de doubles jonctions de Holliday (DJH) et la stabilisation des fourches de réplication bloquées (Wu & Hickson, 2006). Le mauvais fonctionnement des hélicases SF2 humaines mène à des maladies associées à l'instabilité génomique et à une prédisposition au cancer, dont les syndromes de Bloom (BLM), Werner (WRN) et de Rothmund-Thomson (RECQ4).

La réplication peut facilement devenir une source d'instabilité génomique, particulièrement au niveau des fourches affaissées devant être réparées par recombinaison homologue (Aguilera & Gomez-Gonzalez, 2008). L'absence de BLM rend une cellule incapable d'accomplir la réplication normalement, notamment par une maturation retardée des fragments d'Okazaki, la présence d'intermédiaires de réplication anormaux et une sensibilité accrue aux inhibiteurs de la réplication (Wu, 2007). L'activité hélicase de BLM permet la modification de la configuration des fourches bloquées afin de permettre leur redémarrage d'une manière dépendante de la recombinaison homologue.

L'hélicase de la famille RecQ forme le complexe RTR avec la topoisomérase III $\alpha$  (hTOPOIII $\alpha$ ) et la protéine de liaison à l'ADN hRMI1 (Wu, 2007). Cette association est elle aussi conservée chez les eucaryotes et nécessaire au maintien de la stabilité du génome (Mankouri & Hickson, 2007). En effet, une délétion d'un de ces trois composants cause des phénotypes semblables, notamment de l'hyper-recombinaison.

La coopération de BLM, la topo III et RmI1 permet d'agir aux doubles jonctions de Holliday par un mécanisme de dissolution dont l'avantage est de générer un produit sans échange de brin. Premièrement, l'hélicase effectue la migration de deux jonctions de Holliday (figure 15A). Une topoisomérase sera nécessaire afin d'éliminer la tension topologique associée à l'avancement des jonctions. La structure formée à ce moment est un héli-caténane puisque les deux duplex sont reliés par un seul brin d'ADN (Mankouri & Hickson, 2007) (figure 15B). La topo III est ensuite ciblée au site par RmI1 afin de résoudre la structure alors que l'hélicase expose l'ADNsb à la topoisomérase (figure 15C). La structure des doubles jonctions de Holliday est très similaire à la structure de deux fourches convergentes (figure 15D) et donc le complexe RTR pourrait certainement agir à la terminaison de la réplication aussi (figure 15E-F).



**Figure 15 Résolution de doubles jonctions de Holliday par dissolution.** **A.** Une double jonction de Holliday (DJH). **B.** L'hélicase fait migrer les deux jonctions l'une vers l'autre, formant un héli-caténane. **C.** Le complexe RTR peut résoudre cette structure sans occasionner d'échange de brin. **D.** Une DJH ressemble à un LRI. **E.** Le complexe RTR pourrait également résoudre le LRI. Le réplisome est représenté de manière simplifiée. **F.** La réplication se poursuit suite à la décaténation des deux molécules. Se référer au texte pour les détails supplémentaires. Figure adaptée avec permission d'Elsevier de (Wu, 2007).

La dissolution des DJH par le complexe RTR est donc comparable à la résolution des LRI par la topoisomérase III, RecQ et SSB d'*E. coli* (Suski & Marians, 2008). D'abord, il est possible que l'hélicase se lie à la jonction de Holliday pour dénaturer un segment du duplex et exposer l'ADNsb. Ensuite, la topo III pourrait passer un brin à travers le second. SSB aiderait l'interaction de ces protéines. Il est également proposé que l'action conjointe de l'hélicase avec la topoisomérase de type IA puisse assurer la directionnalité de l'échange de brin (Plank & Hsieh, 2009). Cette alliance expliquerait également pourquoi la topoisomérase III parvient à effectuer la caténation de deux molécules d'ADNdb seulement lorsque RecQ est présent (Harmon *et al.*, 1999). Chez *Escherichia coli*, la protéine RecQ est impliquée pour transformer les structures aux fourches de réplication bloquées. RecQ permettrait ainsi d'exposer de l'ADNsb permettant la liaison de RecA et l'activation de la réponse SOS (Hishida *et al.*, 2004).

### 1.4.3 Au niveau de la recombinaison

Ainsi, le synchronisme de l'initiation de la réplication et le bon déroulement de l'élongation sont nécessaires pour garantir une ségrégation correcte. Outre les défauts de ségrégation, une conséquence du mauvais fonctionnement de ces étapes serait la fragmentation du chromosome par des nombreux bris doubles brins dans l'ADN. Ces bris devront être réparés par RecA et RecBCD pour éviter l'endommagement du chromosome et chez les eucaryotes, des systèmes de réparation des bris doubles brins défectueux sont associés avec l'activation d'oncogènes et l'instabilité génomique (Pardo *et al.*, 2009).

Un groupe a recherché les gènes qui ne peuvent pas être inactivés si RecA est également absent afin de trouver les stratégies de prévention de fragmentation de l'ADN (Kouzminova *et al.*, 2004). Parmi les mutants co-létaux avec *recA*, de nombreux gènes responsables du maintien de la synchronie ont été identifiés, dont *smtA* (membre de l'opéron *mukBEF*), *seqA* et *topA* (Kouzminova *et al.*, 2004). Des mutants *seqA* ou *topA* possèdent de l'ADN fragmenté et ont une réponse SOS activée. Les auteurs mentionnent également que des protéines impliquées dans l'élongation de la réplication, comme la polymérase I, la ligase et la gyrase présentent également un

phénotype de dépendance à RecA lorsqu'elles sont mutées (Kouzminova *et al.*, 2004). Les systèmes de recombinaison et de réplication sont donc étroitement liés afin d'assurer la ségrégation des chromosomes.

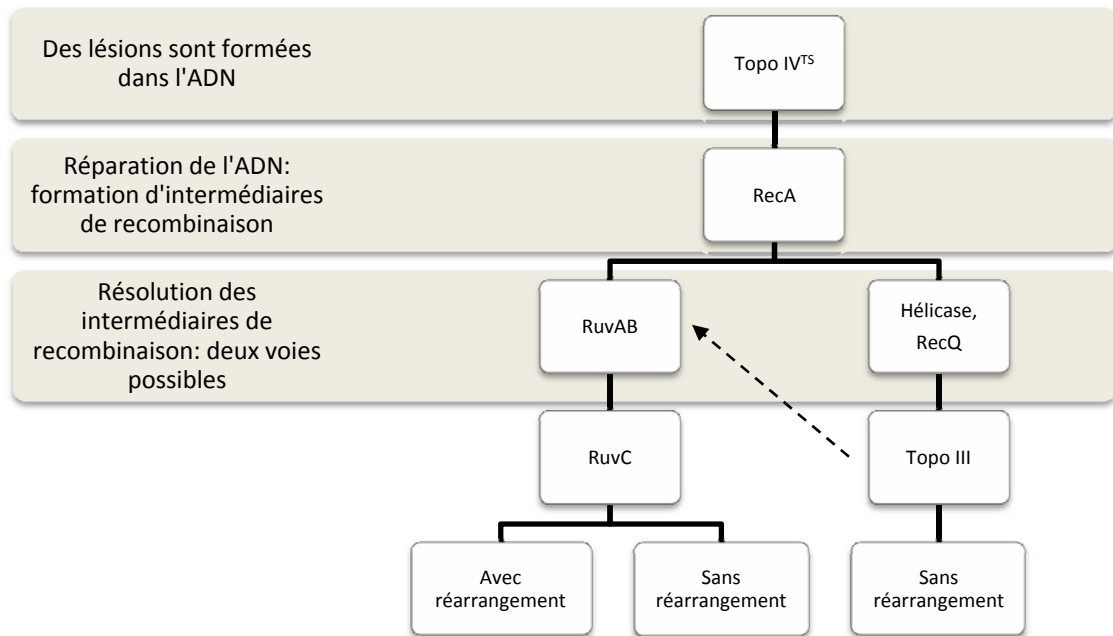
D'ailleurs, un mutant *recA* croît plus lentement et seulement 50% de la population de cellules est viable et ce nombre diminue à environ 20% si le système *recBCD* est également absent (Capaldo *et al.*, 1974). Le cycle cellulaire d'un mutant *recA* est asynchrone (Skarstad *et al.*, 1986). La cause de cette asynchronie est attribuée à la dégradation des chromosomes lorsqu'une souche *recA* ne peut plus réparer correctement son ADN (Skarstad & Boye, 1993).

Alors que dans certains cas l'inactivation de *recA* est létale, dans d'autres situations une souche survie mieux sans RecA. Un rôle pour les topoisomérases de type IA est proposé au niveau de la résolution d'intermédiaires de recombinaison afin d'assurer une bonne séparation des chromosomes (Zhu *et al.*, 2001). La délétion des deux topoisomérases de type IA a été réalisée conditionnellement à l'expression de *topB* sur un plasmide. Lorsque le plasmide est réprimé, il est possible d'observer qu'un double mutant *topA topB* d'*Escherichia coli* donne des cellules formant de longs filaments à l'intérieur desquels l'ADN est anormalement réparti (Zhu *et al.*, 2001). Ces défauts de ségrégation étaient corrigés si la souche était également *recA*, mais pas avec l'introduction de *lexA3* (Zhu *et al.*, 2001). Cet allèle correspond à un répresseur de la réponse SOS qui ne peut plus être clivé par RecA, empêchant ainsi l'activation de la réponse SOS, et cette astuce est utilisée afin de déterminer quel rôle de RecA est impliqué. Or, dans ce cas-ci, le rôle pour les topoisomérases de type IA suggéré est en lien avec la recombinaison et non pas avec la réponse SOS. Ces topoisomérases pourraient agir au niveau de la résolution de jonctions de Holliday à partir de l'ADNsb présent. Sans RecA, la formation des intermédiaires de recombinaison est prévenue et l'absence des topoisomérases I et III est donc mieux tolérée.

Cette correction par *recA* est également observée chez un double mutant *topB parE<sup>TS</sup>*. Ce mutant n'est pas viable, mais une correction est possible par une délétion de *recA* et non pas par l'insertion de l'allèle *lexA3* (Lopez *et al.*, 2005). Donc, c'est bien l'inhibition de l'activité de recombinaison de RecA qui corrige le double mutant



topo III topo IV. De plus, ce double mutant peut être corrigé en surproduisant *ruvABC*. Considérant que le système RuvABC agit aux jonctions de Holliday, les auteurs suggèrent un rôle pour la topoisomérase III dans la résolution d'intermédiaire de recombinaison dans une voie parallèle au système RuvABC et cette voie générerait toujours un produit sans réarrangement de brins (Lopez *et al.*, 2005) (figure 16).



**Figure 16** Modèle proposé pour la résolution d'intermédiaires de recombinaison par la topoisomérase III. Suite à une lésion dans l'ADN, RecA est recruté et un intermédiaire de recombinaison est créé. Celui-ci peut être résolu par le système RuvABC, générant un produit avec ou sans échange de brin. Alternativement, une hélicase pourrait créer un substrat sur lequel la topo III agira. Cette voie génère uniquement un produit sans réarrangement. Se référer au texte pour les détails supplémentaires. Figure adaptée avec permission de *Wiley InterScience* de (Lopez *et al.*, 2005).

L'avantage d'un tel rôle pour la topoisomérase III est que cela offre un mécanisme pour éviter la recombinaison illégitime et l'instabilité génomique, comme cela est le cas chez les eucaryotes. Enlever RecQ, le partenaire de la topo III, permet également de corriger l'invivabilité du mutant *topB parE<sup>TS</sup>* (Lopez *et al.*, 2005), car sans la topoisomérase III pour résoudre la structure, il est plus avantageux à la cellule de ne pas créer l'intermédiaire.

Ce rôle pour la topoisomérase III dans la résolution d'intermédiaires de recombinaison est semblable à celui proposé pour la topoisomérase III humaine. De plus, par son contrôle sur le maintien de l'intégrité chromosomique, ce modèle parvient à recréer les conséquences d'instabilité génomique retrouvées chez l'humain. Toutefois, tel que vu dans la section précédente, la topoisomérase de type IA pourrait aussi participer à la résolution d'intermédiaires de réplication (Suski & Marians, 2008). L'attribution du rôle de topo III dans la recombinaison est surtout basée sur la correction des défauts de ségrégation par la délétion de *recA* (Zhu *et al.*, 2001, Lopez *et al.*, 2005). Bien que ces deux rôles ne soient pas nécessairement mutuellement exclusifs, la correction par *recA* peut également être expliquée dans le cadre d'un rôle au niveau de la réplication. Si la topo III résout les structures en fin de réplication (figure 11), son absence provoquerait également un nombre plus important de fourches bloquées et donc d'intermédiaires de recombinaison (Suski & Marians, 2008). À ce moment, bien que la décaténation puisse toujours se produire à l'aide des topoisomérases de type IIA (figure 10), enlever RecA pourrait aussi être bénéfique à la cellule afin d'éviter que les chromosomes ne soient encore liés par recombinaison.

#### **1.4.4 Au niveau de la décaténation**

L'étape finale de décaténation des chromosomes est clairement indispensable à une bonne ségrégation des chromosomes et la topoisomérase IV est essentielle à la viabilité des cellules (Kato *et al.*, 1990). Des mutants pour la topo IV présentent donc des défauts de partition, soit des nucléoïdes plus larges et localisés au centre de la cellule (Kato *et al.*, 1988, Kato *et al.*, 1990). L'ADN extrait de cellules dont la topoisomérase IV est inhibée se retrouve sous forme de caténanes (Adams *et al.*, 1992).

L'inactivation de la gyrase mène également à des cellules dont les nucléoïdes ne sont pas partitionnés (filaments dont l'ADN demeure au centre) ainsi qu'à des cellules anucléées (Kato *et al.*, 1989). Les nucléoïdes se présentent sous une forme bilobée où il est possible d'observer une connexion entre les deux chromosomes (Steck & Drlica, 1984). En conséquence, il a longtemps été suggéré que la gyrase puisse agir pour séparer les chromosomes. De plus, les quinolones étaient utilisées

pour étudier le rôle de la gyrase avant que la topoisomérase IV ne soit découverte et qu'il soit subséquemment démontré que la topo IV est également une cible de l'antibiotique (Khodursky *et al.*, 1995). Toutefois, il est maintenant clair que la gyrase n'est que très peu efficace à la décaténation et que le problème de ségrégation observé est indirect. C'est bien la topoisomérase IV qui est la décaténase principale de la cellule (Zechiedrich & Cozzarelli, 1995, Zechiedrich *et al.*, 1997). Une baisse du niveau de surenroulement cause également une inhibition de la décaténation (Zechiedrich *et al.*, 1997). Or, il est possible qu'en l'absence de la gyrase, le manque de surenroulement négatif empêche la topo IV de correctement séparer les chromosomes, d'où les défauts de partition. Considérant le rôle de la gyrase dans l'avancement de la fourche de réplication, il est également possible que le phénotype observé suite à l'inhibition de la gyrase provienne de nombreuses collisions de fourches de réplication et l'hyper-recombinaison subséquente.

#### **1.4.5 Le double mutant *topA rnhA***

Ainsi, une gyrase partiellement inhibée est moins efficace pour assurer la progression de la réplication. Des plus, des mutations dans la topoisomérase I et dans la RNase HI sont toutes deux à la source d'asynchronisme et de la formation de R-loops. Il n'est donc pas surprenant que la combinaison de ces mutations soit létale (Drolet *et al.*, 1995). Un mutant *gyrB<sup>TS</sup> topA rnhA* a été construit conditionnellement à la surexpression de la topoisomérase III (Usongo *et al.*, 2008). Celui-ci présente des défauts de ségrégation qui sont différents de ceux obtenus par une simple mutation des gènes impliqués. La délétion de *rnhA* dans une souche *gyrB<sup>TS</sup> topA* cause donc des défauts de ségrégation : de longs filaments sont formés et ceux-ci sont remplis d'ADN. La mauvaise ségrégation des chromosomes résulte également en de nombreuses cellules anucléées. En plus de la ségrégation erronée, il a été observé chez ce triple mutant conditionnel qu'un mécanisme cellulaire mène à l'inhibition de la gyrase et le manque de surenroulement de l'ADN contribue à la létalité. À l'heure actuelle, la voie d'inhibition de la gyrase par la cellule est une avenue de recherche dans le laboratoire. Ce système représente également une opportunité d'étudier le rôle *in vivo* de la topoisomérase III.

### 1.4.6 Objectifs

Ainsi, malgré les nombreuses possibilités d'action de la topoisomérase III, son rôle dans la cellule demeure une source de débat. Sa délétion n'entraîne que très peu de conséquences pour la cellule, contrairement aux eucaryotes. Par contre, la délétion des topoisomérases I et III mène à d'importants problèmes de ségrégation. Mon projet vise à préciser les fonctions *in vivo* des topoisomérases de type IA chez *Escherichia coli*. Mon hypothèse est que, tandis que la topoisomérase I aide à la régulation du cycle cellulaire, la topoisomérase III assure la progression des fourches de réplication, rôle dont l'importance pour la ségrégation des chromosomes est révélée lorsque l'activité de la gyrase n'est pas optimale. Mon objectif est de démontrer un lien entre l'activité de la gyrase et celle des topoisomérases de type IA.

## 2. Résultats

### 2.1 Introduction à l'article

*Escherichia coli* possède deux topoisomérases (topos) de type IA, soit la topo I (*topA*) et la topo III (*topB*). La fonction principale de la topo I est la relaxation de l'excès de surenroulement négatif. Il y a peu d'information disponible sur la topoisomérase III. Les défauts sévères de ségrégation des chromosomes d'un double mutant *topA topB* peuvent être corrigés par la délétion de *recA*. Cette découverte suggère un rôle pour les topos I et III dans la résolution d'intermédiaires de recombinaison. *In vitro*, il a été démontré que la topoisomérase III peut également remplacer la gyrase pour son rôle au niveau de la progression des fourches de réplication convergentes. Une telle association entre la topo III et la gyrase n'a toujours pas été établie *in vivo*. Nous démontrons que, chez des cellules dont les topos I et III sont manquantes, les défauts de croissance et de ségrégation sont surtout reliés à la présence de mutations dans la gyrase. La mutation *topA* est à l'origine de ces mutations compensatoires dans la gyrase, qui sont nécessaires afin d'éviter un excès de surenroulement négatif. Dans une souche dont les topos de type IA sont manquantes, nous avons constaté que l'augmentation de l'activité de la gyrase permet d'améliorer significativement la croissance et les défauts de ségrégation normalement associés à une souche *topA topB*. Nous avons testé l'augmentation de l'activité de la gyrase par plusieurs techniques, soit par des mutations spontanées, par la substitution de l'allèle *gyrB*<sup>TS</sup> par un allèle de type sauvage et par l'exposition d'une souche possédant l'allèle *gyrB* thermosensible à des températures permissives. Nous avons également trouvé que les mutants *topB* sont hypersensibles à la novobiocine et que ceci est causé par l'inhibition de la gyrase. Nos données suggèrent également que lorsque de la réplication aberrante se produit qu'en l'absence de la topoisomérase I ou de la RNase HI (*rnhA*), la nécessité pour l'activité de la topoisomérase III est amplifiée. Sous ces conditions, la topo III peut également réduire la dégradation intensive de l'ADN observée suite à la délétion du gène *recA*. Nous suggérons un rôle pour la topoisomérase III au niveau de réplication et de la ségrégation qui est révélé lorsque l'activité de la gyrase n'est pas optimale. Le rôle de la topo III consisterait à

réduire les arrêts de progression et les collisions des fourches de réplication qui surviennent lorsque la régulation de la réplication fait défaut, en l'occurrence par l'absence de la topo I ou de la RNase HI.

En tant que première auteure de l'article « Interplay between type IA topoisomerases and gyrase in chromosome segregation in *Escherichia coli* », j'ai contribué à la majorité des résultats. Les souches utilisées dans la figure 1 ont été construites par Valentine Usongo et Flora Nolent, qui ont également effectué les analyses d'activité de la gyrase (figure 1C) et de gel de chloroquine (fig. 1D). J'ai effectué les tests de croissance (fig. 1A), l'analyse *Western Blot* (fig. 1B), la microscopie et le compte de cellule (fig. 2), de même que les analyses de sensibilité à la novobiocine (fig. 3AB) sur ces souches. Les résultats d'incorporation de thymidine radioactive (fig. 4A, C, fig. 8C) sont des résultats non-publiés du laboratoire ainsi que des expériences réalisées par Flora Nolent. J'ai construit la souche CT170 et fait les expériences de croissance et de microscopie associées (fig. 5AB, fig. 6). J'ai réalisé les expériences de cytométrie en flux (fig. 7) et la microscopie présentée à la figure 8. J'ai également réalisé les figures supplémentaires S1 et S2. L'article présenté en annexe (Usongo *et al.*, 2008) est à la source du présent article et, en tant que quatrième auteure, j'ai contribué aux analyses de microscopie à fluorescence du triple mutant VU22 ainsi que des souches contrôles.

## **2.2 Interplay between type IA topoisomerases and gyrase in chromosome segregation in *Escherichia coli***

**Interplay between type IA topoisomerases and gyrase in  
chromosome segregation in *Escherichia coli***

Cynthia Tanguay<sup>1</sup>, Valentine Usongo<sup>1</sup>, Flora Nolent<sup>1</sup> and Marc Drolet<sup>1,2</sup>

1- Département de microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, C. P.  
6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, P. Québec, Canada, H3C 3J7

2- Corresponding author

Phone : [REDACTED]

Fax : [REDACTED]

Email : [REDACTED]

Manuscrit soumis à la revue *Molecular Microbiology*.

**Abstract**

*E. coli* possesses two type IA topoisomerases (topos), namely topo I (*topA*) and topo III (*topB*). The major function of topo I is the relaxation of excess negative supercoiling. Much less is known about the function of topo III. Cells lacking both type IA topos suffer from severe chromosome segregation and growth defects. We show that these defects are mostly related to the presence of gyrase mutations that prevent excess negative supercoiling in *topA* null mutants. Indeed, increasing gyrase activity by spontaneous mutations, by substituting a *gyrB*(Ts) allele for a wild-type one or by exposing cells carrying the *gyrB*(Ts) allele to permissive temperatures, significantly corrected the growth and segregation defects of cells lacking type IA topo activity. We also found that *topB* mutants are hypersensitive to novobiocin due to gyrase inhibition. Our data also suggest that unregulated replication occurring in the absence of *topA* and *rnhA* (RNase HI) exacerbates the need for topo III activity. Moreover, when *topA* and *rnhA* were absent, we found that topo III overproduction reduced the extensive DNA degradation that took place in the absence of *recA* (RecA). All together, our results lead us to propose a role for topo III in chromosome segregation when gyrase activity is suboptimal, thus reducing replication forks collapse, especially when replication is unregulated due to the absence of topo I and RNase HI.



## Résumé français

Les topoisomérases I (*topA*) et III (*topB*) sont les deux topoisomérases (topos) de type IA d'*Escherichia coli*. La fonction principale de la topo I est la relaxation de l'excès de surenroulement négatif, tandis que peu d'information est disponible sur le rôle de la topo III. Les cellules pour lesquelles les deux topoisomérases de type IA sont manquantes souffrent d'une croissance difficile ainsi que de défauts de ségrégation sévères. Nous démontrons que ces problèmes sont majoritairement attribuables à des mutations dans la gyrase qui empêchent l'accumulation de surenroulement négatif en excès chez les mutants sans *topA*. L'augmentation de l'activité de la gyrase réalisée soit par le remplacement de l'allèle *gyrB*(Ts) par le gène de type sauvage ou par l'exposition des souches *gyrB*(Ts) à une température permissive, permet la correction significative de la croissance et de la ségrégation des cellules sans activité de topos de type IA. Nous démontrons également que les mutants *topB* sont hypersensibles à l'inhibition de la gyrase par la novobiocine. La réplication non-régulée en l'absence de *topA* et de *rnhA* (RNase HI) augmente la nécessité de l'activité de la topoisomérase III pour la cellule. De plus, en l'absence de *topA* et de *rnhA*, la surproduction de la topoisomérase III permet de réduire la dégradation importante d'ADN qui est observée en l'absence de *recA* (RecA). Nous proposons un rôle pour la topoisomérase III dans la ségrégation des chromosomes lorsque l'activité de la gyrase n'est pas optimale, par la réduction des collisions fourches de réplication s'observant particulièrement en l'absence de la topo I et de la RNase HI.

## Introduction

Type IA topoisomerases are ubiquitous enzymes found in eubacteria, archaeobacteria and eukaryotes (Champoux, 2001). They cleave one DNA strand at a time to change the DNA linking number in steps of one, and they all require, to various extents depending on the enzyme, an exposed single-stranded region within the DNA substrate. *E. coli* possesses two type IA enzymes, namely topo I (*topA*) and topo III (*topB*). Topo I binds to single-stranded DNA regions close to double-stranded ones (Kirkegaard and Wang, 1985) thus explaining its major role in the relaxation of excess negative supercoiling (Drlica, 1992). Consistent with this function is the finding that many *topA* mutants can grow owing to the presence of compensatory mutations in *gyrA* or *gyrB* that reduce the supercoiling activity of gyrase (DiNardo *et al.*, 1982; Pruss *et al.*, 1982). One major consequence of excess negative supercoiling is R-loop formation and RNA degradation (Massé and Drolet, 1999; Drolet, 2006; Baaklini *et al.*, 2008).

Topo III is a very low abundant protein (DiGate and Marians, 1989) and its cellular role is not well defined. This is largely due to the fact that, as opposed to *topA* null mutants, *topB* null mutants display no gross phenotype (they grow as well as wild-type strains, at least under standard laboratory conditions (DiGate and Marians, 1989)). Topo III requires stable single-stranded DNA regions for activity and does not efficiently relax negatively supercoiled DNA (DiGate and Marians, 1988). In fact, topo III plays no role in supercoiling regulation *in vivo* (Zechiedrich *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2005).

*In vitro*, topo III is a potent decatenase provided that single-stranded regions are present on the DNA (DiGate and Marians, 1988). In *in vitro* replication reactions, topo III, but not topo I, can substitute for DNA gyrase and topo IV, respectively to solve the topological problem associated with replication forks movement and to fully decatenate the replicated DNA molecules (Hiasa and Marians, 1994; Hiasa *et al.*, 1994). More recently, it has been shown *in vitro* that *E. coli* topo III together with RecQ and SSB can act at converging replication forks to topologically unlink the late replication intermediates (Suski and Marians, 2008). In this reaction, RecQ helicase

provided the single-stranded DNA substrate to which topo III could bind. SSB protein, by interacting with both proteins, mediated the functional cooperation between RecQ and topo III. Topo I could not substitute for topo III in this reaction. In *E. coli*, overproduction of topo III at very high levels can rescue both the growth and chromosome segregation defects of thermosensitive topo IV mutants at the non-permissive temperature (Nurse *et al.*, 2003). However, in this case, RecQ was not required thus suggesting that the single-stranded DNA substrate for topo III was provided by another helicase or that this substrate was naturally present and available during replication (e.g. at the replication fork or on the lagging strand; Nurse *et al.*, 2003). A role for a type IA topo in the resolution of late mitochondrial DNA replication intermediates in trypanosomes has recently been demonstrated (Scoocca and Shapiro, 2008).

Double *topA topB* null mutants (also carrying *gyrA* or *gyrB* mutations) of *E. coli* display severe chromosome segregation defects that can eventually lead to cell death (Zhu *et al.*, 2001). Because deleting *recA* rescued both the growth and segregation defects of these mutants, it was proposed that type IA topoisomerases are required to resolve recombination intermediates to allow proper chromosomal segregation. Biochemical and genetic evidence in eukaryotes support a role for topo III with RecQ-like helicases in the resolution of recombination intermediates to avoid hyper-recombination that can lead to genomic instability and chromosome segregation defects (Mankouri and Hickson, 2007).

We recently found that the depletion of RNase HI (*rnhA* gene) activity in a *topA* null *gyrB*(Ts) mutant triggered a cellular response that led to the inhibition of the supercoiling activity of gyrase (Usongo *et al.*, 2008). Interestingly, depletion of RNase HI activity in this mutant also leads to chromosome segregation defects and growth inhibition. As topo III overproduction rescued both the segregation and growth defects, we considered the possibility that topo III could somehow compensate for a weak gyrase activity that inhibited chromosome segregation. We present evidence for the existence of an interplay between gyrase and topo III by first showing that spontaneous suppressors of the growth and segregation defects of a

triple *topA rnhA gyrB(Ts)* mutant (i.e. suppression in the absence of topo III overproduction) had their gyrase supercoiling activity increased. An even better suppression of the chromosome segregation defects could be observed by substituting the *gyrB(Ts)* allele for a *gyrB<sup>+</sup>* one. Moreover, we discovered that the severe growth and segregation defects of a double *topA topB* null mutant are mostly related to the presence of a gyrase mutation compensating for the absence of topo I. Finally, we found that deleting *topA* and *rnhA* caused DNA replication to become unregulated and that topo III could reduce the extensive DNA degradation seen in *recA<sup>-</sup>*-derivatives of a *topA rnhA gyrB(Ts)* mutant.

Altogether, our data allow us to propose a model for the role of type IA topoisomerases in replication and chromosome segregation in *E. coli*. Topo I acts to allow replication initiation from *oriC* to be properly regulated and topo III facilitates the processing of the converging replication forks. This allows chromosome segregation to take place and reduces the probability of forks collapse that lead to dsDNA breaks (DSBs).

## Results

### **Increasing gyrase activity in a *topA rnhA gyrB(Ts)* mutant allowed chromosome segregation and growth independent of topo III overproduction**

We have previously described a *topA gyrB(Ts)* mutant in which the depletion of RNase HI (*rnhA*) activity triggered the inhibition of the supercoiling activity of gyrase and lead to chromosome segregation defects and growth inhibition (Usongo *et al.*, 2008). This extensive supercoiling inhibition was similarly observed in a triple *topA rnhA gyrB(Ts)* mutant in which topo III overproduction, from an IPTG-inducible *topB* gene on a plasmid (strain SB383), corrected both the growth and chromosome segregation defects. To better understand the mechanism responsible for the chromosome segregation defects and its correction by topo III overproduction, we first isolated spontaneous suppressors of strain SB383 on LB medium lacking IPTG (see *Experimental Procedures*). Two suppressors (VU149 and VU150) were shown to generate colonies after an overnight incubation on LB plates in the absence of IPTG, whereas the original strain, SB383, did not (Fig. 1a, -IPTG, compare VU149 and VU150 with SB383). Western blot experiments indicated that the suppression was not due to mutations causing *topB* gene expression from the plasmid to increase (Fig. 1b).

Next, cells of SB383, VU149 and VU150 strains were stained with DAPI and prepared for fluorescence microscopy to examine cell morphology and DNA content. As previously shown (Usongo *et al.*, 2008), cells of SB383 grown in liquid medium in the absence of IPTG formed very long filaments with unsegregated nucleoids having altered structures (22% of the cells; Fig. 2 and Fig. 1, supporting information). Anucleate cells and cells with low DNA content, both indicative of chromosome segregation defects, were also produced at high frequencies (29 and 21%, respectively). Most of the cells with low DNA content were small and had their DNA close to one pole (Fig. 1, supporting information); such cells could result from septum closure on nucleoids, a classic manifestation of segregation defects (guillotine effect; Niki *et al.*, 1991). When IPTG was added to overproduce topo III, the proportion of cells with chromosome segregation defects was dramatically reduced

(Fig. 2. long filaments, 5%; anucleate cells, 15% and cells with low DNA content, 8%). Cells of VU149 and VU150 grown in the absence of IPTG produced significantly less cells with chromosome segregation defects as compared to SB383 cells grown under the same conditions (Fig. 2; long filaments, 5 and 8%; anucleate cells, 22 and 20% and cells with low DNA contents, 9 and 6%, respectively for VU149 and VU150). The addition of IPTG to VU149 and VU150 cell cultures further reduced the proportion of such cells. Thus, the growth of the suppressors independent of topo III overproduction correlated with decreased chromosome segregation defects.

To address the possibility that the improved ability of the suppressors to segregate their chromosome and to grow could be due to mutations increasing gyrase activity, we prepared extracts of SB383, VU149 and VU150 cells for supercoiling assays. In agreement with our hypothesis, extracts of VU149 and VU150 cells exhibited more supercoiling activity than extracts of SB383 cells (Fig. 1c, SB383, lanes 2 and 3; VU149, lanes 4 and 5 and VU150, lanes 6 and 7). To further examine supercoiling activity, we made use of the finding that the strong supercoiling stimulation by translation inhibitors that give rise to hypernegatively supercoiled DNA in *topA* null mutants (Broccoli *et al.*, 2004) is not seen when *rnhA* is absent (Usongo *et al.*, 2008). This reflects gyrase supercoiling inhibition triggered by the absence of RNase HI. The results shown in fig. 1d (left panel) demonstrated that, indeed, the production of hypernegatively supercoiled DNA seen in the *topA* null *gyrB*(Ts) mutant (strain RFM475, lane 2) following the addition of spectinomycin, was not observed in the *topA rnhA gyrB*(Ts) mutant (strain SB383, lane 1). However, a small amount of hypernegatively supercoiled DNA could be detected for the suppressors (strains VU149 and VU150, lanes 3 and 4, respectively), thus suggesting that gyrase supercoiling activity was indeed increased in these strains.

Next, as our results suggested that gyrase activity was increased in the suppressors, we sequenced the *gyrA* and *gyrB* genes from strains VU149 and VU150, including their promoter region (not shown). Apart from the two mutations already

present in the *gyrB*(Ts) allele, no other mutations were found in either *gyrA* or *gyrB* (not shown).

At this stage, we could not exclude the possibility that the increased supercoiling activity seen in the suppressors was somehow an indirect consequence of mutations correcting both the growth and chromosome segregation defects. Therefore, to better test the hypothesis that topo III acts by compensating for the weak gyrase activity in strain SB383, we performed P1*vir* transduction to replace the *gyrB*(Ts) allele of strain SB383 with a wild-type one. Although the *gyrB*(Ts) allele present in strain SB383 compensates for the lack of *topA*, we reasoned that the response leading to gyrase inhibition in the absence of RNase HI would be sufficient to allow a *gyrB*<sup>+</sup>-derivative of SB383 to grow. Indeed, *gyrB*<sup>+</sup> transductants of strain SB383 were readily obtained and, as expected if the response leading to gyrase inhibition was still expressed, hypernegative supercoiling was not observed following the addition of a translation inhibitor (Fig. 1d, middle panel, lane 2, strain NF98). Extracts of NF98 cells exhibited strong supercoiling activity (Fig. 1c, lanes 8 and 9) that was significantly higher than the one seen in crude cell extracts of VU149 and VU150 strains. In addition, since the *gyrB*(Ts) allele was substituted for a wild-type one, steady-state supercoiling was significantly higher in strain NF98 as compared to SB383 (Fig. 1d, right panel, lane 1, SB383 and lane 2, NF98). Thus, despite the response leading to gyrase inhibition due to the absence of RNase HI, gyrase supercoiling activity was higher in strain NF98 as compared to strains SB383, VU149 and VU150.

If topo III overproduction compensated for a defective gyrase activity that led to chromosome segregation defects in strain SB383, we expected not only that such defects would be corrected in the *gyrB*<sup>+</sup>-derivative of SB383 (strain NF98) independent of topo III overproduction, but also that this correction would be better as compared to strains VU149 and VU150. As predicted, cells of strain NF98 grown in the absence of IPTG produced much less anucleate cells as compared to the other strains grown under the same conditions (Fig. 2; 29, 22, 20 and 2% of anucleate cells, respectively for strains SB383, VU149, VU150 and NF98). Cells with low DNA

contents and long filaments with unsegregated nucleoids were also produced in low amounts in strain NF98. Noticeably, the suppression was so efficient in this strain, that the addition of IPTG to overproduce topo III did not further reduce the number of cells with chromosome segregation defects. As expected, strain NF98 was able to grow overnight on LB plates in the absence of IPTG (Fig. 1a). Thus, the chromosome segregation defects of strain SB383 correlated with the inability of gyrase to supercoil DNA or to remove replication-induced positive supercoiling (same enzymatic reaction in both cases). Under these conditions, a sufficient amount of topo III allowed the chromosomes to be properly segregated.

### **Hypersensitivity of a *topB* null mutant to the gyrase inhibitor, novobiocin**

To further study the interplay between gyrase and topo III *in vivo*, we tested the sensitivity of a *topB* null mutant (strain CT77) to the gyrase supercoiling inhibitor, novobiocin. As can be seen in fig. 3a, while the growth of wild-type cells (strain RFM443) was still visible on LB plates with novobiocin at 300 µg/ml, the growth of strain CT77 was barely detected on LB plates containing novobiocin at 150 µg/ml. This hypersensitivity of cells lacking topo III activity to novobiocin is also illustrated by the 5 log drop in the efficiency of plating of strain CT77 relative to strain RFM443, on LB plates containing novobiocin at 150 µg/ml (fig. 3b).

Topo IV is also a target for novobiocin, although the primary target in *E. coli* is gyrase (Khodursky *et al*, 2000). To verify that the hypersensitivity of strain CT77 to novobiocin is mostly related to gyrase inhibition, we constructed a double *gyrB*(Ts) *topB* mutant (strain CT78). Apart from the mutation causing gyrase activity to be thermosensitive, this *gyrB*(Ts) allele also carries another mutation conferring resistance to novobiocin (Menzel and Gellert, 1983). As shown in fig. 3a, the growth of strain CT78 on LB plates was very similar to the growth of the isogenic *gyrB*(Ts) mutant (strain RFM445) at all novobiocin concentrations tested (LB plates were incubated at 28°C so that the Ts gyrase phenotype was not expressed). This result indicated that the novobiocin hypersensitivity in the absence of topo III is related to gyrase inhibition.



Novobiocin, by interfering with the ATPase reaction of the GyrB subunit of gyrase, specifically inhibits its supercoiling reaction and therefore the ability of the enzyme to remove replication-induced positive supercoiling. The growth inhibitory effect and lethal action of other gyrase inhibitors such as oxolinic acid and norfloxacin that target the GyrA subunit, is not related to supercoiling inhibition but to the trapping of gyrase on DNA as drug-enzyme-DNA complexes, which causes fragmentation of the bacterial chromosome (Drlica *et al.*, 2008). We tested the sensitivity of our *topB* null mutant (strain CT77) to these drugs, and found no significant differences in their sensitivity as compared to the wild-type isogenic strain (strain RFM443; not shown). Thus, cells lacking topo III activity are exceedingly sensitive to the inhibition of the supercoiling reaction of gyrase. This is in agreement with the interplay described above between gyrase and topo III in chromosome segregation.

#### **Deleting *topA* corrected the growth and replication initiation defects of the *gyrB*(Ts) mutant**

Based on the findings described above, a *gyrB*(Ts) *topB* null mutant could be expected to be more thermosensitive than a single *gyrB*(Ts) mutant. However, no differences could be observed in colony size between strains CT78 and RFM445 at different temperatures up to 42°C, where none of the strains grew (not shown). The thermosensitive growth of strains bearing the *gyrB*(Ts) allele used in our study has been previously shown to be related to defective replication initiation not elongation (Filutowicz and Jonczyk, 1981 and 1983; Khodursky *et al.*, 2000). Therefore, since topo III acts after initiation its absence was not expected to significantly affect the thermosensitive growth of strains carrying this *gyrB*(Ts) allele. The replication defect of a strain carrying this *gyrB*(Ts) allele was also observed at the semi-permissive temperature of 37°C (Fig. 4a). It can be seen that [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation was reduced by 2- to 3-fold in the *gyrB*(Ts) strain (RFM445, squares) as compared to the isogenic wild-type strain (RFM443, diamonds), when cells were grown at 37°C. As expected, we found that this replication defect was not observed at the permissive temperature of 28°C (not shown and Baaklini *et al.*, 2004).

We found that deleting *topA* allowed the *gyrB*(Ts) strain to grow at 42°C (Fig. 4b; strain RFM475). This strongly suggested that the absence of topo I corrected the replication defect of the *gyrB*(Ts) allele. This was shown to be the case as [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation in strain RFM475 (fig. 4a, triangles) was found to be as good as in the wild-type strain (RFM443, diamonds), and therefore 2- to 3-fold better than in the *gyrB*(Ts) strain (RFM445, squares). The results of the pulse-labelling experiment with [<sup>3</sup>H]-thymidine (after the addition of chloramphenicol to inhibit replication initiation, to follow the rate of DNA synthesis) indicated that replication elongation was not defective in the *gyrB*(Ts) strain compared to the *topA gyrB*(Ts) strain (Fig. 4c, squares and triangles, respectively). This confirmed that the reduced ability of the *gyrB*(Ts) strain to incorporate [<sup>3</sup>H]-thymidine (Fig. 4a) was mostly related to defective replication initiation, not elongation. We note, however, that defects in the late step of chromosome replication, i.e. when two replication forks converge at the terminus region, will not be revealed by the pulse-labelling experiment. Thus, deleting the *topA* gene corrected the replication initiation defect of a strain carrying the *gyrB*(Ts) allele.

#### **A defective gyrase strongly exacerbated the growth and chromosome segregation defects of a *topA topB* mutant**

The correction of the replication initiation defect of the *gyrB*(Ts) strain by deleting *topA* gave us the opportunity to test the interplay between gyrase and topo III in chromosome segregation in this strain. By using P1*vir* transduction, we introduced a *topB* null allele within the *topA gyrB*(Ts) strain (RFM475). As a control of transduction efficiency, we also introduced the *topB* null allele within isogenic wild-type (RM443) and *gyrB*(Ts) (RFM445) strains. For these strains, *topB* null transductants were obtained after 18 hours of incubation at 37°C, whereas 48 hours were required to obtain the transductants of strain RFM475 at the same temperature. The total number of transductants obtained per experiment was always between 60 and 100 for each strain (at least two experiments per strain), except for strain RFM443 that gave more than 300 transductants in one experiment. The disruption of the *topB* gene was confirmed by PCR for 8 transductants of each group (not shown).

Upon restreaking on LB plates, transductants of strains RFM443 and RFM445 formed medium-size colonies after 18 hrs of incubation, whereas it took 48 hours for the RFM475 transductants to form colonies of similar size (not shown). The vast majority of the colonies obtained after 48 hours were homogeneous in size. We obtained similar results for strain DM800, a widely used *topA* null mutant that also contains the naturally acquired *gyrB225* compensatory mutation (DiNardo *et al.*, 1982), i.e. 48 hours of incubation to obtain between 60 to 100 transductants per experiment and 48 hours for these transductants to regrow on LB plates (not shown). Similar results in terms of the number of transductants and their growth rate were also reported by another group for strain DM750, a *topA* null mutant carrying the naturally acquired *gyrA224* compensatory mutation (Li *et al.*, 2006). Thus, *E. coli* cells lacking both type IA topoisomerases are viable, but grow slowly.

Next, we tested the ability of *topA gyrB*(Ts) cells lacking the *topB* gene to form colonies on LB plates at 35 and 42°C. Fig. 5a shows that, whereas RFM475 cells grew better at 42°C than at 35°C, cells of strain CT170, a *topB* null transductant of strain RFM475, formed colonies at 35°C but did not grow at 42°C. The growth behaviour of strain RFM475 was previously reported and was shown to be due to the reactivation of gyrase activity as the temperature was decreased, so that the *gyrB*(Ts) allele could no longer compensate for the absence of topoisomerase I (Drolet *et al.*, 1995). The opposite growth behaviour of strain CT170 is novel and is further addressed below.

The growth of the two isogenic strains (RFM475 and CT170) was also monitored in liquid medium at different temperatures and cell samples were recovered for DAPI staining and prepared for fluorescence microscopy to examine cell morphology and DNA content. As was the case on LB plates, the growth rate at 35°C was very similar for both strains, whereas it increased and decreased as the temperature was raised up to 40°C, respectively, for strains RFM475 and CT170 (Fig. 5b). Moreover, major differences between the strains were observed from 39°C. At 40°C, the growth of strain CT170 stopped during log phase at an  $OD_{600}$  of 0.6.

One typical phenotype of *topA topB* null mutants that was previously reported is the formation of very long filaments with unsegregated nucleoids having abnormal

structures (Zhu *et al.*, 2001). Such filamentous cells were also observed for our *topA topB* null mutant (strain CT170; fig. 6, long filaments (>14 chr./cell) and Fig. 2, supporting information). Importantly, the proportion of such cells dramatically increased as the incubation temperature was raised from 39°C, with a maximum being reached at 40°C (Fig. 6, 3% vs. 24%, respectively, for 37 and 40°C; this roughly corresponds, respectively, to 20% and 70% of the total cell mass). Thus, the accumulation of such filaments correlated with the growth defect (Fig. 5b).

The proportion of anucleate cells also considerably increased at 39°C (Fig. 6, 4% vs. 56%, respectively, for 37 and 39°C). Although the isogenic RFM475 strain (*topA gyrB(Ts)*) did not significantly form very long filaments at all temperatures tested (less than 1% at 40°C), it also produced a large proportion of anucleate cells at higher temperatures (less than 0.1% vs. 40%, respectively, for 37 and 40°C). An important fraction of the anucleate cells in strains CT170 and RFM475 is likely related to defective gyrase activity (*gyrB(Ts)* allele) that affects chromosome segregation (Steck and Drlica, 1984; Kato *et al.*, 1989). Indeed, anucleate cells also accumulated at very high frequency in strain RFM445 (*gyrB(Ts)*; 0.1% vs. 67%, respectively, for 37 and 40°C; not shown). However, RFM445 produced much less of the very long filaments than CT170 (3% vs. 24%, respectively, for RFM445 and CT170 at 40°C). The growth rate of strain RFM445 was also significantly higher than the one of CT170 at 40°C and its growth stopped during late log phase (at an OD<sub>600</sub> of 1). Thus, the major chromosome segregation defects due to the absence of topo III in strain CT170, as shown by the formation of very long filaments with altered nucleoid structures, is mostly apparent when a defective gyrase activity already perturbs this key process of the cell cycle. This supports the hypothesis that topo III and gyrase activities can somehow substitute for each other to allow chromosome segregation to be completed.

### **The absence of *topA* and *rnhA* caused unregulated, aberrant replication**

Replication initiation that takes place at *oriC* is tightly regulated so that it occurs once and only once per cell cycle (Leonard and Grimwade, 2010). This process is synchronized with the “initiation mass”. Unregulated replication initiation

could be especially harmful when gyrase activity is suboptimal for replication fork progression and chromosome segregation. Interestingly, flow cytometry studies have revealed unregulated replication in the *topA* null mutant DM800 (Olsson *et al.*, 2003). We used flow cytometry in rifampicin run-out experiments to investigate the regulation of replication initiation in several of the isogenic strains used in our study (see *Experimental Procedure*). As shown in Fig. 7, both RFM443 (wild-type) and RFM445 (*gyrB*(Ts)) cells contained  $2^n$  chromosomes following run-out experiments, thus showing that replication initiation was synchronized (regulated) in these strains. However, the removal of the *topA* gene from the *gyrB*(Ts) strain eliminated the  $2^n$  chromosomes pattern (strain RFM475). Thus, the absence of topo I caused replication initiation to be unregulated in strain RFM475.

In the absence of RNase HI, replication can initiate from R-loops at sites other than *oriC* (Kogoma, 1997). Several of these sites (*oriKs*) are located close to the *ter* region. Replication in *rnhA* mutants was named cSDR (constitutive stable DNA replication) because it could continue for several hours following the addition of protein synthesis inhibitors. cSDR is not synchronized with the cell cycle but is sensitive to rifampicin. Our rifampicin run-out experiments indicated that replication in *rnhA* cells was indeed highly asynchronous (unregulated), with a wide distribution of DNA and an almost complete loss of discrete chromosomal peaks being observed (Fig. 7; strain PH379).

The propensity of SB383 cells (*topA rnhA gyrB*(Ts)) not overproducing topo III (-IPTG) to produce very long filaments precluded their use in flow cytometry analysis. Therefore, SB383 cells grown in the presence of IPTG were used in the run-out experiment shown in Fig. 7. As expected, when both RNase HI and topo I were absent replication was highly asynchronous (Fig. 7, strain SB383). An even wider distribution of DNA as compared to a strain lacking *rnhA* alone, and a complete loss of discrete chromosomal peaks was also observed. Interestingly, a similar pattern of chromosome distribution with the absence of discrete peaks was also observed for *dnaA*(cos) cells that overinitiate replication from *oriC* and for two extragenic suppressors of *dnaA*(cos) (Nordman *et al.*, 2007). The absence of well-defined peaks

likely reflects the occurrence of incomplete rounds of chromosome replication (Nordman *et al.*, 2007). Thus, cells lacking both *rnhA* and *topA* have unregulated and aberrant replication that may be particularly harmful for strain SB383 in which gyrase activity is inhibited.

### **Reckless DNA degradation in a *recA*<sup>-</sup>-derivative of the *topA rnhA gyrB*(Ts) strain and its partial correction by overproducing topo III**

Previous results support a model of increased head-to-tail fork collisions in *dnaA*(cos) mutants that ultimately lead to fork collapse and DSBs (Simmons *et al.*, 2004; Nordman *et al.*, 2007). Such DSBs are normally repaired by a pathway involving RecA, thus explaining why deleting *recA* further reduced the viability of a *dnaA*(cos) mutant (Felczak and Kaguni, 2009). We studied the effect of deleting *recA* on the growth, viability, cell morphology and DNA content of strain SB383 (*topA gyrB*(Ts) *rnhA*) in which unregulated replication initiation is also taking place. We found that deleting *recA* allowed IPTG-independent growth of strain SB383, although growth was very slow (three days to see colonies on LB Plates) and was still stimulated by topo III overproduction (Fig. 8a). In liquid LB medium, the growth was also very slow as it took between 8 to 10 hours and 13 to 15 hours for *recA*<sup>-</sup>-derivatives of SB383 to reach the mid-log phase, respectively, when topo III was overproduced or not overproduced (not shown; for *recA*<sup>+</sup>-derivatives of SB383 these values were, respectively, 3 and 4.5 hours).

We found that the major chromosome segregation defect of strain SB383, illustrated by the formation of very long filaments with altered nucleoid structures, was almost fully corrected by deleting the *recA* gene. Indeed, whereas the proportion of such cells was 5 and 22% respectively, when topo III was overproduced or not overproduced in the *recA*<sup>+</sup>-derivative of SB383, this proportion dropped to close to 1% irrespective of topo III overproduction in the two *recA*<sup>-</sup>-derivatives of SB383 used in our study (Fig. 2). This result likely explains the ability of the *recA*<sup>-</sup> derivatives of SB383 to form colonies in the absence of topo III overproduction.

Deleting *recA* from strain SB383 increased the proportion of cells with low DNA contents from 21 to 55% (Fig. 2 and Fig. 1, supporting information). Topo III overproduction reduced the proportion of such cells from 55 to 35% in the two *recA*<sup>-</sup>-derivatives. In fact, in the *recA*<sup>-</sup>-derivatives of strain SB383, topo III overproduction only reduced the proportion of cells with low DNA contents. For one *recA*<sup>-</sup>-derivative, overproducing topo III even increased the proportion of anucleate cells from 9 to 16% (SB383 *recA*-2). We believe that the anucleate cells and the cells with low DNA contents for the *recA*<sup>-</sup>-derivatives were not the result of chromosome segregation defects as was the case for the *recA*<sup>+</sup>-derivatives. They were most likely due to “reckless” DNA degradation, a phenomenon caused by the absence of RecA that allows the RecBCD enzyme to extensively degrade DNA from unrepaired DSBs (Willetts and Clark, 1969; Capaldo and Barbour, 1975). Indeed, anucleate cells and cells with low DNA contents that are the result of chromosome segregation defects should be small as they never contained a full set of genes allowing them to grow. Moreover cells with low DNA contents as a result of the “guillotine effect” should have their DNA close to one pole. Although small cells with no DNA or with a small amount of DNA close to one pole were observed for the *recA*<sup>+</sup>-derivative of SB383, cells of various sizes (including filaments) that contained no DNA or few DNA spot(s) randomly distributed were observed for the *recA*<sup>-</sup>-derivatives (Fig. 8b). The fact that topo III overproduction increased the number of anucleate cells could be explained by a reduced occurrence of DSBs in these cells so that the DNA repair machinery would not be saturated. RecBCD enzyme would then be present in sufficient amount to completely degrade the DNA from the fewer double-stranded DNA ends present in these cells. Thus, SB383 cells lacking *recA*, especially those not overproducing topo III, suffer from extensive DNA degradation.

Interestingly, our microarray results indicated that the SOS response was constitutively expressed in *topA rnhA gyrB*(Ts) mutants (not shown). RecA protein is therefore overproduced in these mutants and is likely required to repair DSBs. We found that introducing the *lexA3* allele that make the SOS response non-inducible and therefore that considerably reduces the amount of RecA proteins produced, allowed the SB383 strain to grow in the absence of topo III overproduction (Fig. 8a).

However, the complementation was not as good as the one conferred by deleting *recA*. Indeed, the efficiency of plating in the absence of IPTG was at least 10 fold lower for the *lexA3*-derivative as compared to the *recA*<sup>-</sup>-derivatives (not shown). Moreover, whereas colonies of the *recA*<sup>-</sup> strains were rather uniform in size, those of the *lexA3* strain were more heterogeneous in size, thus suggesting the accumulation of compensatory mutations in the latter (Fig. 8a, -IPTG). SB383 cell morphology and DNA content was similarly affected by the *lexA3* mutation as compared to the *recA* mutation (not shown). We also found that deleting *sfiA* from strain SB383, a member of the SOS regulon encoding for a cell division inhibitor, had no effects on cell morphology and DNA content and did not allow IPTG-independent growth on LB plates (not shown). Thus, the *lexA3* mutation likely acted by reducing the amount of RecA proteins in SB383 cells.

We performed an additional experiment to demonstrate more directly the occurrence of “reckless” DNA degradation in our *recA*<sup>-</sup>-derivatives of strain SB383. The DNA of *recA*<sup>+</sup> and *recA*<sup>-</sup>-derivatives of strain SB383 was labelled with [<sup>3</sup>H]-thymidine, and DNA degradation was estimated from the loss of radioactivity following the transfer of the cells in nonradioactive medium. Our results showed that no significant DNA degradation occurred in the *recA*<sup>+</sup>-derivative of strain SB383 after 150 min of incubation in the nonradioactive medium (Fig. 8c;). However, extensive DNA degradation was observed in the *recA*<sup>-</sup>-derivative of strain SB383 after the same period of incubation especially when topo III was not overproduced (55% vs 35% of radioactivity loss, respectively, when topo III was not overproduced or overproduced). Although relatively small, the effect of topo III overproduction on DNA degradation as measured by the loss of radioactivity was in agreement with the data obtained following the microscopic examination of DAPI-stained cells (Fig. 2; 70% vs 50% of cells with no DNA or low DNA content when topo III was, respectively, not overproduced or overproduced). Thus, deleting *recA* allowed *topA rnhA gyrB*(Ts) cells (strain SB383) to survive without topo III overproduction by correcting the chromosome segregation defects. However, the *recA*<sup>-</sup> cells grew very poorly due to “reckless” DNA degradation. Importantly, topo III reduced reckless DNA degradation thus showing that it acted before RecA.



### **Overproduction of RuvABC had no effects on the growth and chromosome segregation defects of the *topA rnhA gyrB*(Ts) strain**

As deleting *recA* corrected both the growth and chromosome segregation defects of *topA topB* null mutants, it has been proposed that type IA topoisomerases are required to resolve recombination intermediates (generated by the action of RecA) in order for chromosome segregation to be completed (Zhu *et al.*, 2001). In another study, it was shown that topo III/IV double mutants, that display *recA*-dependent growth inhibition similar to *topA topB* null mutants, could be constructed when RuvABC was overproduced from a plasmid. The authors proposed the existence of a topo III pathway for the resolution of recombination intermediates that can be used as an alternative to the RuvABC pathway (Lopez *et al.*, 2005).

To test the possibility that the chromosome segregation defects of strain SB383 is due to the accumulation of RecA-dependent recombination intermediates, we transformed this strain with the plasmid pGBruvABC that has also been used in the study on topo III/IV double mutants (Lopez *et al.*, 2005). We found that the growth of strain SB383 carrying pGBruvABC was still fully dependent on topo III overproduction (not shown). The inability of pGBruvABC to improve the growth of strain SB383 was further illustrated by the 3 log drop in the efficiency of plating of strain SB383 when topo III was not overproduced, irrespective of the presence of this plasmid (Table 1). Examination of DAPI stained by fluorescence microscopy also revealed that the presence of pGBruvABC in strain SB383 had no effects on cell morphology and DNA content (not shown). Thus, the improved ability of SB383 strain carrying pGBruvABC to resolve RecA-mediated recombination intermediates had no effect on its growth and chromosome segregation defects. So, by causing extensive DNA degradation, the absence of RecA may have sufficiently reduced the amount of cellular DNA to facilitate the action of topoisomerases in replication and chromosome segregation, while keeping in some cells at least one full chromosome to allow their survival.

## Discussion

### Interplay between gyrase and topo III in chromosome segregation

We have provided experimental evidence for the existence of interplay between gyrase and topo III in chromosome segregation in *E. coli*. Interestingly, the first mutation isolated that caused a chromosome segregation defect mapped to a subunit of gyrase (Kato *et al.*, 1989). The lack of supercoiling due to defective gyrase activity could in principle lead to segregation defects by hindering chromosome condensation (Sawitzke and Austin, 2000). However, as topo III plays no role in supercoiling regulation and most of all, does not introduce supercoiling, the interplay between topo III and gyrase is unlikely to be related to chromosome condensation. Based on the observation that the dumbbell-shaped nucleoids isolated from a *gyrB*(Ts) mutant incubated at restrictive temperatures could be resolved by purified gyrase, a role for this enzyme in chromosome decatenation was proposed (Steck and Drlica, 1984). However, as topo IV, not gyrase, was later shown to be the major cellular decatenase *in vivo* (Adams *et al.*, 1992; Peng and Marians, 1993), this result suggested that the gyrase mutation somehow reduced the efficiency of decatenation by topo IV.

Gyrase, in an ATP-dependent reaction, removes the left-handed positive supercoils that accumulate in front of moving replication forks. In fact, it is believed that most of the intertwining generated by replication is normally eliminated by gyrase (Wang *et al.*, 2008). However, the left-handed positive supercoils, when not efficiently removed by gyrase, can diffuse behind the replication fork to form right-handed positive precatenanes that could be removed by topo IV (Champoux and Been, 1980; Ullsperger *et al.*, 1995; Hiasa and Marians, 1996). If they are not unlinked before the end of replication, such precatenanes become catenanes that must be removed by topo IV in order for chromosome segregation to take place. In an *in vitro oriC*-based plasmid system, replication could be fully completed despite the absence of gyrase during the replication reaction (Hiasa and Marians, 1994). Moreover, chromosome replication in a strain carrying the same *gyrB*(Ts) allele as the one used in the present study, was shown to be completed at the non-permissive

temperature, demonstrating that the chromosome segregation defect of the strain was not due to a failure to terminate chromosome replication (Steck and Drlica, 1984). Thus, although most linkage generated by replication is normally removed by the action of gyrase, replication can be completed in the absence of this enzyme. However, linkage must somehow (e.g. in the form of precatenanes and catenanes; Hiasa and Marians, 1996) be removed before chromosome segregation can take place.

Replication-induced positive supercoiling becomes particularly problematic when convergent replication forks are about to meet at the *ter* region. Not only a very high level of positive supercoiling accumulates, the space on the DNA template becomes too small to accommodate the binding of gyrase. At this stage, two alternative pathways have been proposed to complete replication (Minden and Marians, 1986; Wang, 1991), while allowing the last intertwinings to be removed to fully decatenate the two replicated chromosomes. In the first pathway, replication is completed before the unravelling of the intertwined parental strands. As a result, the intertwined parental strands are converted to intertwinings between the newly replicated chromosomes (catenanes). These catenanes are removed by topo IV. Thus, one major factor that determines the amount of precatenanes and catenanes to be removed by topo IV is the efficiency with which gyrase can relax the replication-induced positive supercoiling.

When highly unregulated replication is taking place and gyrase activity is defective, as in the case in our *topA rnhA gyrB(Ts)* mutant (strain SB383), precatenanes and catenanes are expected to accumulate. This could lead to chromosome segregation defects as right-handed positive precatenanes/catenanes are good substrates for topo IV only when their density is low so their crossing angle is optimal for enzyme activity (Stone *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008). Moreover, the decatenation reaction of topo IV is stimulated by negative supercoiling (Ullsperger and Cozzarelli, 1996; Zechiedrich *et al.*, 1997; Holmes and Cozzarelli, 2000; Witz and Stasiak, 2010). Thus, defective gyrase can presumably lead to chromosome segregation defects indirectly by rendering the decatenation reaction of topo IV

inefficient, for at least two reasons: the accumulation of precatenanes and catenanes at high density and the lack of supercoiling.

In the second pathway for replication termination at converging forks, unlinking of the parental DNA strands precedes their replication. In this pathway, a type IA enzyme can bind to a ssDNA region and unlink the parental strands (Minden and Marians, 1986; Wang, 1991). In their study demonstrating that topo III overproduction at very high level was able to rescue both the growth and chromosome segregation defects of strains carrying a thermosensitive topo IV, Nurse *et al.*, (2003) also showed that topo III could efficiently unlink precatenanes *in vitro*. However, as ssDNA regions are expected to form only transiently and since topo III is normally a very low abundant protein, it has been difficult to pinpoint the exact site of action of topo III *in vivo*. The ability of topo III to physically interact with SSB protein, as recently demonstrated in the *in vitro* reaction where topo III together with RecQ helicase and SSB were shown to efficiently unlink convergent replication forks (Suski and Marians, 2008), may explain how topo III could function *in vivo*. Indeed, topo III could be brought to ssDNA regions at any places where SSB is already bound, though it may have to compete with the many other proteins that also interact with SSB (Kozlov *et al.*, 2010).

The interplay between topo III and gyrase as shown here could then be explained in the context of the two pathways for the resolution of converging replication forks, with the goal of keeping the precatenanes/catenanes density low enough for topo IV to achieve the final decatenation step, before chromosome segregation. So, when gyrase activity is defective, the topo III pathway needs to be very efficient to prevent the accumulation of precatenanes and catenanes. Moreover, a defective gyrase should make replication in the *ter* region more difficult and lead to an increase in the extent of unreplicated parental DNA between the converging forks. This slowing down of replication fork progression should also favour unlinking of the parental DNA strands by topo III before replication is completed, thus inhibiting the formation of full catenanes. Conversely, when topo III activity is defective, gyrase must be very efficient to remove the maximum of linkage during replication to

prevent the accumulation of precatenanes/catenanes. When topo IV is defective and gyrase activity is unaffected, topo III must be very active at converging forks to unlink the parental DNA strands before replication is terminated. Thus, together with the ability of gyrase to remove the left-handed positive supercoils, the other important factor that may determine the amount of precatenanes and catenanes to be removed by topo IV is the efficiency of the topo III decatenation pathway.

### **Function of topo I and RNase HI in chromosome segregation**

The severe chromosome segregation and growth phenotypes seen here in the *topA topB gyrB*(Ts) strain CT170 were not observed in the isogenic *topA*<sup>+</sup> strain (not shown). Given that topo I and III are both type IA enzymes, the obvious explanation would be that topo I can substitute for topo III in chromosome segregation (Zhu *et al.*, 2001). Although this could occur, an alternative and non-mutually exclusive explanation, that may indeed reflect a real function of topo I, would be that it indirectly affects chromosome segregation by limiting firing from *oriC*. By doing so, topo I would control the number of replication forks travelling on the chromosome. This would facilitate linkage removal, especially when gyrase is defective, as is often the case in *topA* mutants. In fact, in an *in vitro oriC*-based replication system, topo III was shown to support replication fork progression and to perform the final decatenation step, whereas inhibition of replication initiation from *oriC* was the only effect seen for topo I (Hiasa and Marians, 1994; Hiasa *et al.*, 1994). Moreover, also supporting the effect of topo I on replication initiation from *oriC* is the observation that a *topA* deletion suppressed the growth defect of a *dnaA46*(Ts) mutant at the non-permissive temperature (Louarn *et al.*, 1984) and that deleting *topA* caused replication from *oriC* to be unregulated (Olsson *et al.*, 2003), as also shown here in our *topA* null strains. Thus, in the *topA gyrB*(Ts) strain, unregulated replication from *oriC* could make the defective gyrase unable to efficiently deal with replication-induced positive supercoiling. The wild-type level of topo III activity would then be indispensable, but sufficient, for chromosome segregation.

In the *topA rnhA gyrB*(Ts) strain SB383, the absence of RNase HI further enhances the level of unregulated replication already caused by the absence of *topA*,

by allowing replication from stable R-loops (cSDR). Moreover, since one major function of topo I is to inhibit R-loop formation (Massé and Drolet, 1999), the absence of *topA* is also expected to stimulate cSDR. Together with the fact that gyrase supercoiling activity is significantly inhibited in the absence of RNase HI (Usongo *et al.*, 2008), this high level of unregulated replication could explain why, in strain SB383, topo III needs to be overproduced to allow growth and chromosome segregation. In this context, our results suggest that the previously reported effect of *rnhA* on chromosome segregation (Usongo *et al.*, 2008) is indirect and likely related to cSDR. Thus, topo I and RNase HI may facilitate chromosome segregation by limiting replication.

### **Interplay between topo III and RecA protein.**

We have shown that SB383 cells (*topA rnhA gyrB(Ts)*) lacking the *recA* gene undergo extensive DNA degradation. Interestingly, “reckless” DNA degradation has also been observed in *recA*-derivatives of gyrase mutants of *Salmonella typhimurium* (Gari *et al.*, 1996). Loss of supercoiling in the chromosomal *ter* region of one of these mutants (GyrB562) has recently been reported (Pang *et al.*, 2005). Since extensive DNA degradation occurred under growth conditions requiring frequent replication initiation from *oriC* (high temperature and rich media), it was hypothesized that this GyrB562 mutant was prone to replication fork collapse in the *ter* region (Pang *et al.*, 2005). Presumably, DSBs were formed when replication forks from a second round of bidirectional replication from *oriC* reached the converging replication forks that were arrested in the *ter* region due to defective gyrase activity. That replication fork collapse can actually occur *in vivo* at *ter* sites has been demonstrated in a strain where *ter* sequences were placed at ectopic positions on the bacterial chromosome (Bidnenko *et al.*, 2002). Moreover, it has been shown that cSDR initiated close to the *ter* region in *rnhA* mutants strongly stimulates recombination in this region (Horiuchi *et al.*, 1994). This can be explained by repeated fork collapse in the *ter* region due to cSDR (Bidnenko *et al.*, 2002). Thus, the severe “reckless” DNA degradation seen in *recA*-derivatives of strain SB383 could have therefore been triggered by frequent

replication forks collapse in the *ter* region due to over-replication originating both from *oriC* and *oriKs* (cSDR), together with the gyrase supercoiling inhibition. Furthermore, because replication originating from *oriKs* is also bidirectional, replication forks, whether originating from *oriC* or from an *oriK*, could have also converged outside the *ter* region and therefore caused fork collapse at many other regions of the chromosome.

The observation that topo III overproduction reduced reckless DNA degradation in *recA*<sup>-</sup>-derivatives of strain SB383, may have given clues as to what could be an important function of the topo III decatenation pathway *in vivo*. Indeed, by facilitating the resolution of converging replication forks, the topo III pathway may significantly reduce the likeliness of fork collapse, especially when cells are exposed to growth conditions promoting high replication rates with multiple initiation events. Our data also suggest that one major consequence of the cell inability to deal efficiently with the topological problem associated with replication could be the formation of DSBs, due to fork collapse. We are currently isolating and characterizing suppressors of the growth defect of strains SB383 and CT170, to further understand the role of type IA topoisomerases in replication and genome maintenance.

## Experimental Procedures

***E. coli* strains.** Strains used in this work are described in Table 2. They were constructed by transduction with phage P1*vir* as previously described (Miller, 1992). When needed, tetracycline (10 µg/ml), or kanamycin (50 µg/ml) was added to the medium. The *gyrB*<sup>+</sup> strains were obtained by using *gyrB*(Ts) recipients and then by selecting transductants for thermo-resistant growth (42°C). The presence of the wild-type *gyrB* allele was confirmed by sequencing. PCR was used to confirm the *recA* deletion on the chromosome of *ΔrecA306 srlR301::Tn10* transductants of SB383. The presence of the *lexA3* allele on the chromosome of strain SB444 was confirmed by sequencing.

**Plasmids.** pPH1243 is a pTrc99a derivative carrying the *topB* gene under the control of the IPTG-inducible *P<sub>trc</sub>* promoter (Broccoli *et al.*, 2000). pGBruvABC has been described previously (Seigneur *et al.*, 1998). In this construct, the *ruv* genes are transcribed from the promoter of the *ruvAB* operon.

**Gyrase assays in crude cell extracts.** The cells were grown and prepared for gyrase assays in crude extracts with relaxed pBR322 DNA as described previously (Usongo *et al.*, 2008).

**Plasmid extraction for supercoiling analysis.** pPH1243 DNA extraction for supercoiling analysis was performed as described previously (Usongo *et al.*, 2008). Chloroquine gel electrophoresis and in situ hybridization of the dried gels were done as previously reported (Usongo *et al.*, 2008).

**Western blot analysis.** The protocol for Western blot analysis with TopB antibodies has been described previously (Usongo *et al.*, 2008).

**Pulse-labelling of DNA.** Pulse-labelling of DNA with [<sup>3</sup>H]-thymidine was performed as shown before (Baaklini *et al.*, 2004).

**Measurement of DNA degradation.** *In vivo* DNA degradation was measured essentially as described by Zahradka *et al.*, (2009). Overnight cultures were diluted 500-fold in LB medium supplemented with cysteine (10 µg/ml), deoxyadenosine (200



$\mu\text{g/ml}$ ), 3  $\mu\text{Ci/ml}$  of [ $^3\text{H}$ ]thymidine (specific activity, 70-90 Ci/mmol; Perkin Elmer, Canada) and with or without IPTG (1mM). Cells were grown at 37°C to an OD<sub>600</sub> of 0.5. The cells were recovered by centrifugation, washed three times with cold phosphate buffer (67 mM) and diluted 50-fold in LB medium. Cells were grown at 37°C and 0.5 ml aliquots were recovered every 30 min. TCA-precipitable  $^3\text{H}$  was recovered and measured in a liquid scintillation counter, as described previously (Baaklini *et al.*, 2004).

**Microscopy.** Cells were grown overnight on LB plates supplemented, when required, with cysteine (50  $\mu\text{g/ml}$ ) and appropriate antibiotics. When needed, IPTG (1 mM) was added to the plates. The plates were incubated at 37 °C. After overnight growth, cells were resuspended in pre-warmed (37 °C) liquid LB medium (supplemented as required) to obtain a starting OD<sub>600</sub> of about 0.01. Cells were grown at 37 °C to an OD<sub>600</sub> of 0.8. The cells were prepared for microscopy as described before (Usongo *et al.*, 2008). Pictures were randomly taken and selected to calculate the number of cells in each category.

**Flow cytometry.** Overnight cultures were prepared, diluted and grown as described for microscopy. When the cell density reached an OD<sub>600</sub> of 0.3, rifampicin (300  $\mu\text{g/ml}$ ) was added to prevent the initiation of new rounds of replication and the cells were incubated for two hours, to allow the ongoing replication rounds to terminate. Cells were washed two times with TE buffer (Tris 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM) before being fixed with ice-cold ethanol (77%). After one wash with TE buffer the cells were stained with SYTO 16 (Molecular Probes). RNase A (200  $\mu\text{g/ml}$ ) was added during the staining (30 min) to minimize the ability of SYTO 16 to bind RNA. Flow cytometry was performed on a Becton Dickinson FACScalibur.

**Acknowledgements**

We thank Russell DiGate for strain DM4100 *ΔtopB::kan* and antibodies. We also thank Serge Sénéchal for excellent technical assistance with flow cytometry. This work was supported by grants from the CIHR and the NSERC to M.D. C.T. and U.V. were supported by a scholarship from la Faculté des études supérieures et postdoctorales from the Université de Montréal.

## References

- Adams, D.E., Shekhtman, E.M., Zechiedrich, E.L., Schmid, M.B. and Cozzarelli, N.R. (1992) The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell* **71**:277-288.
- Baaklini, I., Hraiky, C., Rallu, F., Tse-Dinh, Y.-C. and Drolet, M (2004) RNase HI is required for efficient full-length RNA synthesis in the absence of topoisomerase I in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **54**: 198-211.
- Baaklini, I., Usongo, V., Sanscartier, P., Nolent, F., Hraiky, C., Drlica, K. and Drolet, M. (2008) Hypernegative supercoiling inhibits growth by causing RNA degradation. *J. Bacteriol.* **190**:7346-7356.
- Bidnenko, V., Ehrlich, S.D. and Michel, B. (2002) Replication fork collapse at replication terminator sequences. *EMBO J* **21**:3898-3907.
- Broccoli, S., Phoenix, P., and Drolet, M. (2000) Isolation of the *topB* gene encoding DNA topoisomerase III as a multicopy suppressor of *topA* null mutations in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **35**: 58-68.
- Broccoli, S., Rallu, F., Sanscartier, P., Cerritelli, S.M., Crouch, R.J. and Drolet, M (2004) Effects of RNA polymerase modifications on transcription-induced supercoiling and associated R-loop formation. *Mol Microbiol* **52**: 1769-1779.
- Capaldo, F.N. and Barbour, S.D. (1975) DNA content, synthesis and integrity in dividing and non-dividing cells of *rec-* strains of *Escherichia coli* K12. *J Mol Biol* **91**:53-66.
- Champoux, J.J. (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* **70**:369-413.
- Champoux J. J. and Been, M.D. (1980) in Mechanistic Studies of DNA Replication and Recombination: ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, ed Alberts B. (Academic Press, Inc. New York), pp 809–815.
- DiGate, R.J. and Marians, K.J. (1988) Identification of a potent decatenating enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **263**:13366-13373.
- DiGate, R.J. and Marians, K.J. (1989) Molecular cloning and DNA sequence analysis of *Escherichia coli topB*, the gene encoding topoisomerase III. *J Biol Chem* **264**: 17924-17930.

- DiNardo, S., Voelkel, K.A., Sternglanz, R., Reynolds, A.E. and Wright, A (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell* **31**: 43-51.
- Drlica, K. (1992) Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol Microbiol* **6**: 425-433.
- Drlica, K., Malik M, Kerns RJ and Zhao X. (2008) Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:385-392.
- Drolet, M. (2006) Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. *Mol Microbiol* **59**: 723-730.
- Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., Massé, E., Liu, L.F. and Crouch, R.J (1995) Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* delta *topA* mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3526-3530.
- Felczak, M.M. and Kaguni, J.M. (2009) DnaAcos hyperinitiates by circumventing regulatory pathways that control the frequency of initiation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **72**:1348-1363.
- Filutowicz, M. and Jonczyk, P. (1981) Essential role of the *gyrB* gene product in the transcriptional event coupled to *dnaA*-dependent initiation of *Escherichia coli* chromosome replication. *Mol Gen Genet* **183**:134-138.
- Filutowicz, M. and Jonczyk, P. (1983) The *gyrB* gene product functions in both initiation and chain polymerization of *Escherichia coli* chromosome replication: suppression of the initiation deficiency in *gyrB-ts* mutants by a class of *rpoB* mutations. *Mol Gen Genet* **191**:282-287.
- Gari, E., Figueroa-Bossi, N., Blanc-Potard, A.B., Spirito, F., Schmid, M.B. and Bossi, L. (1996) A class of gyrase mutants of *Salmonella typhimurium* show quinolone-like lethality and require *rec* functions for viability. *Mol Microbiol* **21**:111-122.
- Hiasa, H. and Marians K.J. (1994) Topoisomerase III, but not topoisomerase I, can support nascent chain elongation during theta-type DNA replication. *J Biol Chem* **269**: 32655-32659.
- Hiasa, H., DiGate, R.J. and Marians, K.J. (1994) Decatenating activity of *Escherichia coli* DNA gyrase and topoisomerases I and III during *oriC* and pBR322 DNA replication *in vitro*. *J Biol Chem* **269**: 2093-2099.
- Hiasa, H. and Marians, K.J. (1996) Two distinct modes of strand unlinking during theta-type DNA replication. *J Biol Chem* **271**:21529-21535.

- Holmes, V.F., and Cozzarelli, N.R. (2000) Closing the ring: Links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 1322-1324.
- Hraiky, C., Raymond, M.A. and Drolet, M (2000) RNase H overproduction corrects a defect at the level of transcription elongation during rRNA synthesis in the absence of DNA topoisomerase I in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**: 11257-11263.
- Kato, J., Nishimura, Y. and Suzuki, H. (1989) *Escherichia coli parA* is an allele of the *gyrB* gene. *Mol Gen Genet* **217**:178-181.
- Khodursky, A.B., Peter, B.J., Schmid, M.B., DeRisi, J., Botstein, D., Brown, P.O. and Cozzarelli, N.R. (2000) Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:9419-9424.
- Kirkegaard, K. and Wang, J.C. (1985) Bacterial DNA topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single-stranded loop. *J Mol Biol* **185**: 625-637.
- Kogoma, T. (1997) Stable DNA replication: interplay between DNA replication homologous recombination, and transcription. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 212-238.
- Kozlov, A.G., Jezewska, M.J., Bujalowski, W. and Lohman, T.M. (2010) Binding specificity of *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein for the chi subunit of DNA pol III holoenzyme and PriA helicase. *Biochemistry* **49**:3555-3566.
- Leonard, A.C. and Grimwade, J.E. 5 January 2010, posting date. Chapter 4.4.1, Initiation of DNA replication. In A. Böck, R. Curtiss III, J. B. Kaper, P. D. Karp, F. C. Neidhardt, T. Nyström, J. M. Slauch, C. L. Squires, and D. Ussery (ed.), *EcoSal—Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. <http://www.ecosal.org>. ASM Press, Washington, DC.
- Li, Z., Hiasa, H. and DiGate, R. (2006) Characterization of a unique type IA topoisomerase in *Bacillus cereus*. *Mol. Microbiol.* **60**:140-151.
- Lopez, C.R., Yang, S., Deibler, R.W., Ray, S.A., Pennington, J.M., DiGate, R.J., Hastings, P.J., Rosenberg, S.M., and Zechiedrich, E.L. (2005) A role for topoisomerase III in a recombination pathway alternative to RuvABC. *Mol. Microbiol.* **58**: 80-101.
- Louarn, J., Bouché, J.P., Patte, J. and Louarn, J.M. (1984) Genetic inactivation of topoisomerase I suppresses a defect in initiation of chromosome replication in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **195**:170-174.

- Mankouri, H.W. and Hickson, I.D. (2007) The RecQ helicase-topoisomerase III-Rmi1 complex: a DNA structure-specific 'dissolvasome'? *Trends Biochem Sci* **32**:538-546.
- Massé, E., Drolet, M (1999) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J Biol Chem* **274**:16659-16664.
- Menzel, R., and Gellert, M. (1983) Regulation of the Genes for *Escherichia coli* DNA Gyrase - Homeostatic Control of DNA Supercoiling. *Cell* **34**:105-113.
- Miller, J.H. (1992) A Short Course in Bacterial Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.
- Minden, J.S. and Marians, K.J. (1986) *Escherichia coli* topoisomerase I can segregate replicating pBR322 daughter DNA molecules *in vitro*. *J Biol Chem* **261**:11906-11917.
- Niki, H., Jaffe, A., Imamura, R., Ogura, T. and Hiraga, S. (1991) The new gene *mukB* codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. *EMBO J* **10**:183-193.
- Nordman, J. Skovgaard, O. and Wright, A. (2007) A novel class of mutations that affect DNA replication in *E. coli*. *Mol Microbiol* **64**:125-138.
- Nurse, P., Levine, C., Hassing, H and Marians, K.J. (2003) Topoisomerase III can serve as the cellular decatenase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**: 8653-8660.
- Olsson, J.A., Nordström, K., Hjort, K. and Dasgupta, S. (2003) Eclipse-synchrony relationship in *Escherichia coli* strains with mutations affecting sequestration, initiation of replication and superhelicity of the bacterial chromosome. *J Mol Biol* **334**:919-931.
- Pang, Z., Chen, R., Manna, D. and Higgins, N.P. (2005) A gyrase mutant with low activity disrupts supercoiling at the replication terminus. *J Bacteriol* **187**:7773-7783.
- Peng, H. and Marians, K.J. (1993) Decatenation activity of topoisomerase IV during *oriC* and pBR322 DNA replication *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:8571-8575.
- Pruss, G.J., Manes, S.H. and Drlica, K (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell* **31**: 35-42.

- Sawitzke, J.A. and Austin, S. (2000) Suppression of chromosome segregation defects of *Escherichia coli muk* mutants by mutations in topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:1671-1676.
- Scocca, J.R. and Shapiro, T.A. (2008) A mitochondrial topoisomerase IA essential for late theta structure resolution in African trypanosomes. *Mol Microbiol* **67**:820-829.
- Seigneur, M., Bidnenko, V., Ehrlich, S.D. and Michel, B. (1998) RuvAB acts at arrested replication forks. *Cell* **95**:419-430.
- Simmons, L.A., Breier, A.M., Cozzarelli, N.R. and Kaguni, J.M. (2004) Hyperinitiation of DNA replication in *Escherichia coli* leads to replication fork collapse and inviability. *Mol Microbiol* **51**: 349-358.
- Steck, T.R. and Drlica, K. (1984) Bacterial chromosome segregation: evidence for DNA gyrase involvement in decatenation. *Cell* **36**: 1081-1088.
- Stone, M.D., Bryant, Z., Crisona, N.J., Smith, S.B., Vologodskii, A., Bustamante, C. and Cozzarelli, N.R. (2003) Chirality sensing by *Escherichia coli* topoisomerase IV and the mechanism of type II topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:8654-8659.
- Suski, C. and Marians, K.J. (2008) Resolution of converging replication forks by RecQ and topoisomerase III. *Cell* **30**:779-789.
- Ullsperger, C. and Cozzarelli, N.R. (1996) Contrasting enzymatic activities of topoisomerase IV and DNA gyrase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **271**:31549-31555.
- Ullsperger C. J., Vologodskii A. A. and Cozzarelli N. R.(1995) in *Nucleic Acids and Molecular Biology*, eds Lilley D. M. J., Eckstein F. (Springer-Verlag, Berlin), pp 115–142.
- Usongo, V., Nolent, F., Sanscartier, P., Tanguay, C., Broccoli, S., Baaklini, I., Drlica, K. and Drolet, M. (2008) Depletion of RNase HI activity in *Escherichia coli* lacking DNA topoisomérase I leads to defects in DNA supercoiling and segregation. *Mol Microbiol* **69**:968-981.
- Wang, J.C. (1991) DNA topoisomerases: why so many? *J Biol Chem* **266**:6659-6662.
- Wang, X., Reyes-Lamothe, R. and Sherratt, D.J. (2008) Modulation of *Escherichia coli* sister chromosome cohesion by topoisomerase IV. *Genes Dev* 2008 **22**:2426-2433.

Willetts, N.S. and Clark, A.J. (1969) Characteristics of some multiply recombination-deficient strains of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **100**:231-239.

Witz, G. and Stasiak, A. (2010) DNA supercoiling and its role in DNA decatenation and unknotting. *Nucleic Acids Res* **38**:2119-2133.

Zechiedrich EL, K.A., Bachellier S, Schneider R, Chen D, Lilley DM and Cozzarelli NR (2000) Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**: 8103-8113.

Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B. and Cozzarelli, N.R. (1997) Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **11**:2580-2592.

Zahradka, K., Buljubasić, M., Petranović, M. and Zahradka, D. (2009) Roles of ExoI and SbcCD nucleases in "reckless" DNA degradation in *recA* mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **191**:1677-1687.

Zhu, Q., Pongpech, P., and DiGate, R.J. (2001) Type I topoisomerase activity is required for proper chromosomal segregation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9766-9771.



## Figure legends

**Fig. 1. Increasing gyrase activity in strain SB383 allowed growth independent of topo III overproduction.** A) Growth of strain SB383 (*topA rnhA gyrB(Ts)*/pPH1243), two of its spontaneous suppressors (VU149 and VU150), and one of its *gyrB*<sup>+</sup>-derivatives (NF98), on LB plates with (1 mM) or without IPTG at 37°C after 24h. B) Western blot showing the level of topo III protein in the strains grown with (1 mM) or without IPTG at 37°C to and OD<sub>600</sub> of 0.6. C) Supercoiling assays in crude cell extracts from the strains grown at 37°C to an OD<sub>600</sub> of 0.7. The amounts of proteins used in the assays were 14 µg (lanes 2, 4, 6 and 8) and 7 µg (3, 5, 7 and 9). D) Left and middle panels: cells were grown in LB with IPTG (1 mM) at 37°C to an OD<sub>600</sub> of 0.6 at which time spectinomycin (250 µg/ml) was added and 15 minutes later the cells were transferred to 28°C for 30 minutes. RFM475 (*topA gyrB(Ts)*/pPH1243) and NF88 (RFM475 *gyrB*<sup>+</sup>)/pPH1243 strains were used as control to show hypernegatively supercoiled DNA. pPH1243 DNA was extracted and the topoisomers were resolved following electrophoresis in an agarose gel containing 7.5 µg/ml of chloroquine. At this chloroquine concentration the relaxed topoisomers migrate more rapidly than the negatively supercoiled ones, except for the hypernegatively supercoiled topoisomers that also migrate rapidly. Right panel: cells were grown in LB at 37°C to an OD<sub>600</sub> of 0.6 at which time pPH1243 DNA was extracted and the topoisomers were resolved as described above. The gels were hybridized with a probe to detect pPH1243 topoisomers. [--] and [rel] respectively point to hypernegatively supercoiled and extensively relaxed DNA.

**Fig. 2. Increasing gyrase activity or deleting the *recA* gene partially corrected the chromosome segregation defect of strain SB383.** Cells were grown and prepared for microscopy as described in *Experimental procedures*. Superimposed pictures of phase contrast and fluorescence (by using Adobe Photoshop) of DAPI-stained cells from strain SB383 (*topA rnhA gyrB(Ts)*/pPH1243), two of its *recA*<sup>-</sup>-derivatives (VU39 and VU40), two of its spontaneous suppressors (VU149 and VU150), and one of its *gyrB*<sup>+</sup>-derivative (NF98) were used to calculate the number of cells in the different categories. Total is the number of cells that were examined to calculate the

percentages of cells in each category. <sup>1</sup>The anucleate cells and low DNA content categories reflect chromosome segregation defects or DNA degradation respectively in *recA*<sup>+</sup> and *recA*<sup>-</sup> cells (see text for details). <sup>2</sup>Cells in the short filaments category have nucleoids that are not fully segregated. These cells are most likely viable since they increase in proportion to strains that grow better (e.g. SB383 + IPTG). Numbers in bold represent the most frequent category in each strain without considering the short filaments category.

**Fig. 3. Hypersensitivity of a *topB* mutant to novobiocin.** A) Cells of strains RFM443 (wild-type), CT77 (RFM443 *topB*), RFM445 (*gyrB*(Ts)) and CT78 (RFM445 *topB*) were grown in LB at 37°C to an OD<sub>600</sub> of 0.7 and were plated on LB without or with novobiocin at the indicated concentration. RFM443 and CT77 were incubated at 37°C for 24h, whereas RFM445 and CT78 were incubated at 28°C for 48h. Note that the *gyrB*(Ts) allele also confers resistance to novobiocin. B) The ability of strains RFM443, CT77 and CT77/pPH1243 to form colonies (cfu) on LB plates with novobiocin. Cells were grown in LB at 37°C to an OD<sub>600</sub> of 0.7, serially diluted and plated on LB without or with novobiocin at 150 µg/ml. When indicated, IPTG (1 mM) was added both during growth in liquid media and in the plates. The plates were incubated at 37°C for 48h. The results shown here are representative of three independent experiments.

**Fig. 4. Complementation of the growth and replication initiation defect of a *gyrB*(Ts) mutant by deleting the *topA* gene.** Cells of strains AQ634 (wild-type), MA249 (AQ634 *gyrB*(Ts)) and MA251 (MA249 *topA*) were grown at 37°C in supplemented VB minimal medium to an OD<sub>600</sub> of 0.4. The cultures of MA249 and MA251 were divided in two and chloramphenicol (150 µg/ml) was added (C), or not added (A), to one half of the cultures to inhibit the initiation of additional rounds of replication from *oriC*. The DNA synthesis rate was measured by pulse-labelling (2 min) with [<sup>3</sup>H]-thymidine every 10 min, as described in *Experimental procedures*. No chloramphenicol was added to the culture of strain AQ634. The results shown here are representative of three independent experiments. AQ634, ◆; MA249, ■; MA251, ▲. B) Cells of strains RFM443 (wild-type) and RFM445 (*gyrB*(Ts)) were grown at

28°C to an OD<sub>600</sub> of 0.7 and streaked on LB plates. The plates were incubated at 42°C for 24h.

**Fig. 5. The growth problem of a double *topA topB* is strongly exacerbated by reducing gyrase activity.** A) Cells of strains RFM475 (*topA gyrB*(Ts)) and CT170 (RFM475 *topB*) were grown at 37°C to an OD<sub>600</sub> of 0.7 and streaked on LB plates. The plates were incubated for 24h at 35 or 42°C as indicated. B) Cell growth of strains RFM475 and CT170 was monitored in liquid LB at 35, 39 and 40°C as indicated.

**Fig. 6. The effect of reducing gyrase activity on cell morphology and DNA content of a double *topA topB* mutant.** Cells were grown and prepared for microscopy as described in *Experimental procedures*. Superimposed pictures of phase contrast and fluorescence (by using Adobe Photoshop) of DAPI-stained cells from strains RFM475 (*topA gyrB*(Ts)) and CT170 (RFM475 *topB*) were used to calculate the number of cells in the different categories. Total is the number of cells that were examined to calculate the percentages of cells in each category. <sup>1</sup>The low DNA content category likely reflects chromosome segregation defects. N/A means that cells in this category were not counted. The estimated size of cells with 6 and 14 chromosomes is indicated by the white lines shown on the right-most picture.

**Fig. 7. Unregulated replication in cells lacking *topA* and/or *rnhA* as shown by flow cytometry.** Cells of strains RFM443 (wild-type), RFM445 (*gyrB*(Ts)), RFM475 (*topA gyrB*(Ts)), PH379 (*rnhA*) and SB383 (*topA rnhA gyrB*(Ts)/pPH1243) were grown in LB to an OD<sub>600</sub> of 0.3, treated with rifampicin (300 µg/ml) for two hours and prepared for flow cytometry as described in *Experimental Procedures*.

**Fig. 8. Growth analysis, DNA degradation measurement and microscopic examination of cell morphology and DNA content in *recA*-derivatives of strain SB383.** A) Cells of strains SB383 (*topA rnhA gyrB*(Ts)/pPH1243), VU39 (SB383 *recA*) and SB444 (SB383 *lexA3*) were streaked on solid LB medium with (1 mM) or without IPTG as indicated. The plates were incubated for 3 days at 37°C. B) Superimposed pictures of phase contrast and fluorescence (by using Adobe

Photoshop) of DAPI-stained cells from strain VU39, showing different kinds of cells with degraded DNA (arrows). C) Cells of strains SB383 and VU39 were grown in the presence of [ $^3\text{H}$ ]-thymidine to an  $\text{OD}_{600}$  of 0.5 as described in *Experimental procedure*. They were washed and grown in nonradioactive medium and samples were withdrawn at the indicated time to determine the amounts of acid-precipitable  $^3\text{H}$  (non-degraded DNA). The values are averages of two to three independent experiments.

**Table 1.** Overproducing RuvABC has no effect on the growth and chromosome segregation defects of strain SB383

Strains	CFU x ml <sup>-1</sup>	
	IPTG (1mM)	-
SB383 + pGB2	3.9 x 10 <sup>7</sup>	3.6 x 10 <sup>4</sup>
SB383 + pGB- <i>ruvABC</i>	3.3 x 10 <sup>7</sup>	3.9 x 10 <sup>4</sup>

**Table 2.** *Escherichia coli* strains used in this study

Strain	Genotype	Source or Ref.
RFM443	<i>rpsL galK2 Δlac74</i>	Drolet <i>et al.</i> , 1995
RFM445	<i>rpsL galK2 gyrB221(cou<sup>R</sup>) gyrB203(Ts) Δlac74</i>	Drolet <i>et al.</i> , 1995
RFM475	<i>rpsL galK2 gyrB221(cou<sup>R</sup>) gyrB203(Ts) Δ(topA cysB)204 Δlac74</i>	Drolet <i>et al.</i> , 1995
NF88	RFM475 <i>gyrB</i> <sup>+</sup>	This work
MD897	DM4100 <i>ΔtopB::Kan</i>	Zhu <i>et al.</i> , 2001
CT77	RFM443 <i>ΔtopB::Kan</i>	This work
CT78	RFM445 <i>ΔtopB::Kan</i>	This work
CT170	RFM475 <i>ΔtopB::Kan</i>	This work
PH379	<i>rpsL, galK2, ΔtrpE rnhA::cam</i>	Usongo <i>et al.</i> , 2008
SB383	RFM475 <i>rnhA::cam</i> pPH1243	Usongo <i>et al.</i> , 2008
VU39	SB383 <i>ΔrecA306 srlR301::Tn10</i>	This work
VU40	SB383 <i>ΔrecA306 srlR301::Tn10</i>	This work
SB444	SB383 <i>lexA3 malF::Tn10</i>	This work
VU149	spontaneous suppressor of SB383 IPTG-independent growth	This work
VU150	spontaneous suppressor of SB383 IPTG-independent growth	This work
NF98	SB383 <i>gyrB</i> <sup>+</sup>	This work
AQ634	<i>ilv metB his-29 trpA9605 pro thyA deoB</i> (or C)	Hraiky <i>et al.</i> , 2000
MA249	AQ634 <i>gyrB221(cou<sup>R</sup>) gyrB203(Ts) zie-3163::Tn10kan</i>	Hraiky <i>et al.</i> , 2000
MA251	MA249 <i>gyrB221(cou<sup>R</sup>) gyrB203(Ts) zie-3163::Tn10kan topA20::Tn10</i>	Hraiky <i>et al.</i> , 2000

Fig. 1a

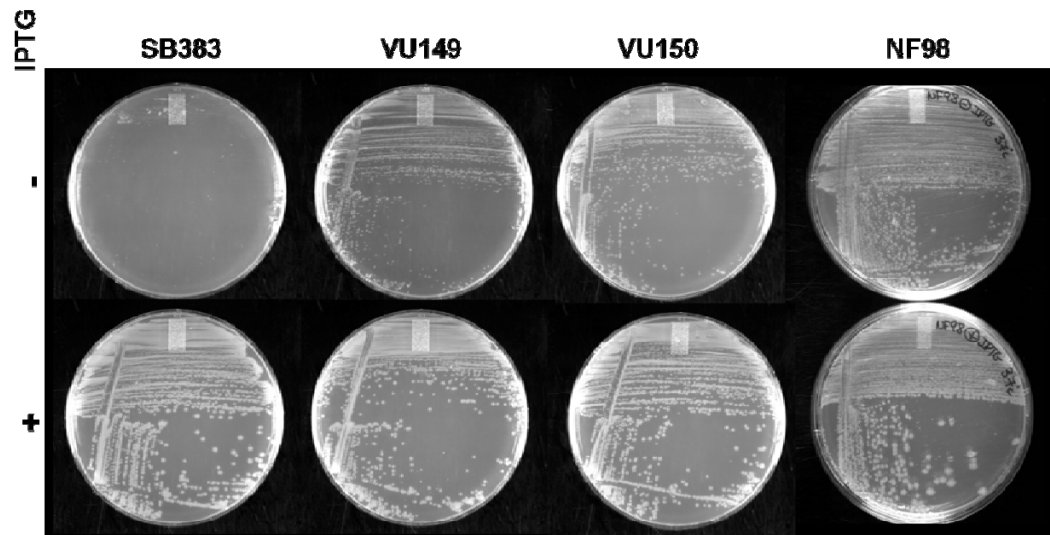


Fig. 1b

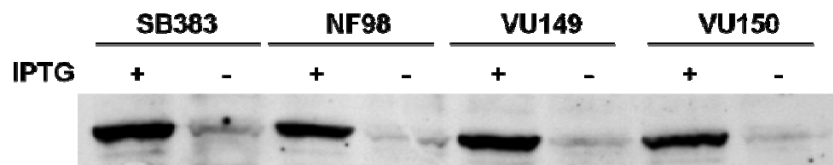


Fig. 1c

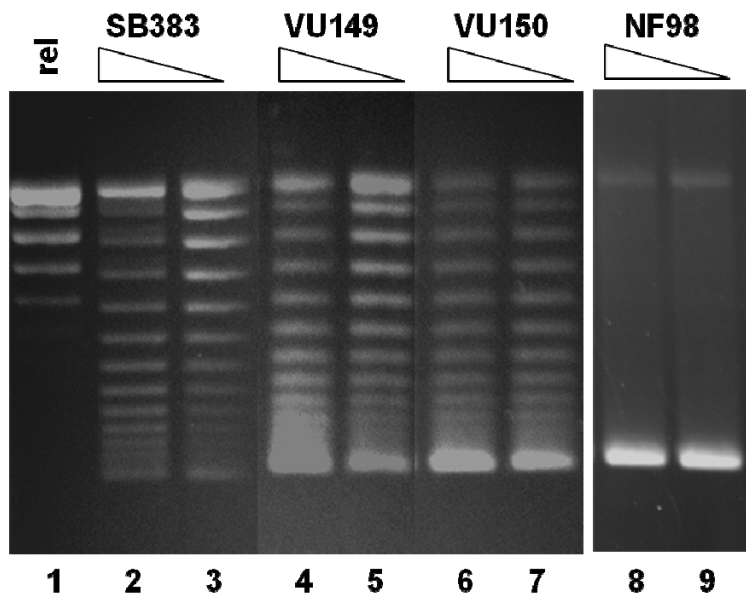


Fig. 1d

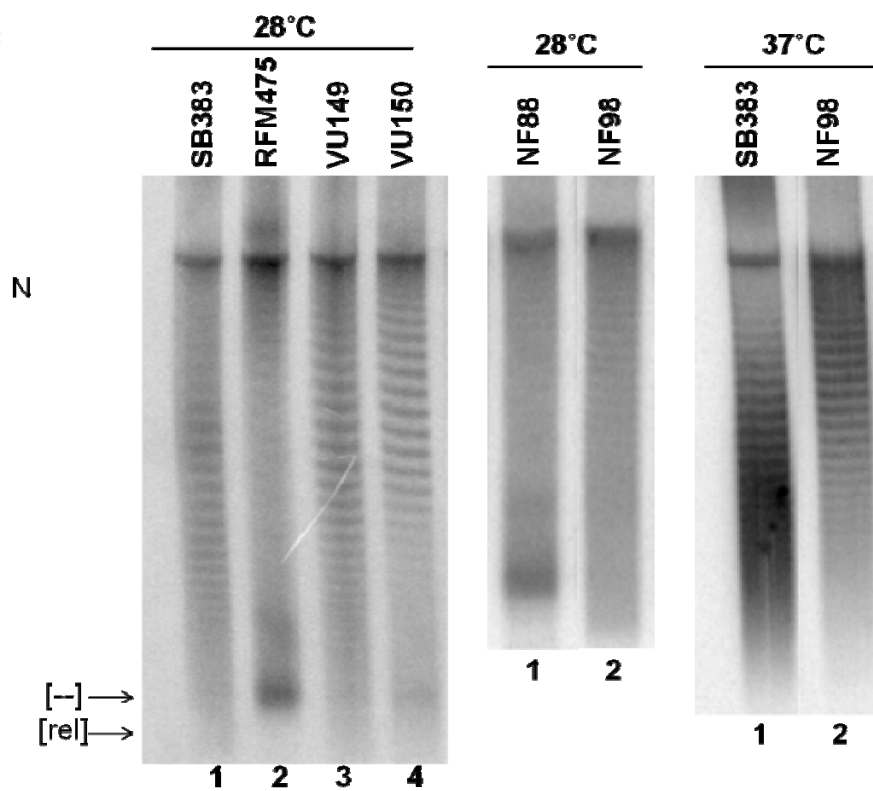




Fig. 2






Strains	IPTG (1mM)	Classification (%)					Total
		Anucleate cells	Low DNA content	Segregated nucleoids	Unsegregated nucleoids, short cells	Unsegregated nucleoids, long filaments	
							
SB383	+	<b>15.5</b>	7.8	<b>18.7</b>	52.7	5.4	1494
	-	<b>29.4</b>	<b>21.3</b>	1.4	25.4	<b>22.6</b>	1307
VU39	+	15.0	<b>37.7</b>	8.5	37.4	1.3	1655
	-	14.2	<b>58.4</b>	1.7	24.3	1.4	1530
VU40	+	15.9	<b>33.4</b>	9.4	39.7	1.6	1408
	-	8.9	<b>55.5</b>	2.7	31.5	1.4	2526
VU149	+	11.2	3.9	<b>19.5</b>	62.8	2.6	877
	-	<b>22.0</b>	8.5	<b>15.4</b>	49.3	4.7	590
VU150	+	10.1	2.5	<b>24.7</b>	58.8	4.0	1004
	-	<b>19.8</b>	5.7	<b>13.5</b>	53.0	8.0	1023
NF98	+	4.0	5.4	<b>18.1</b>	67.5	5.0	846
	-	2.3	6.7	<b>19.6</b>	67.2	4.2	741

Fig. 3a

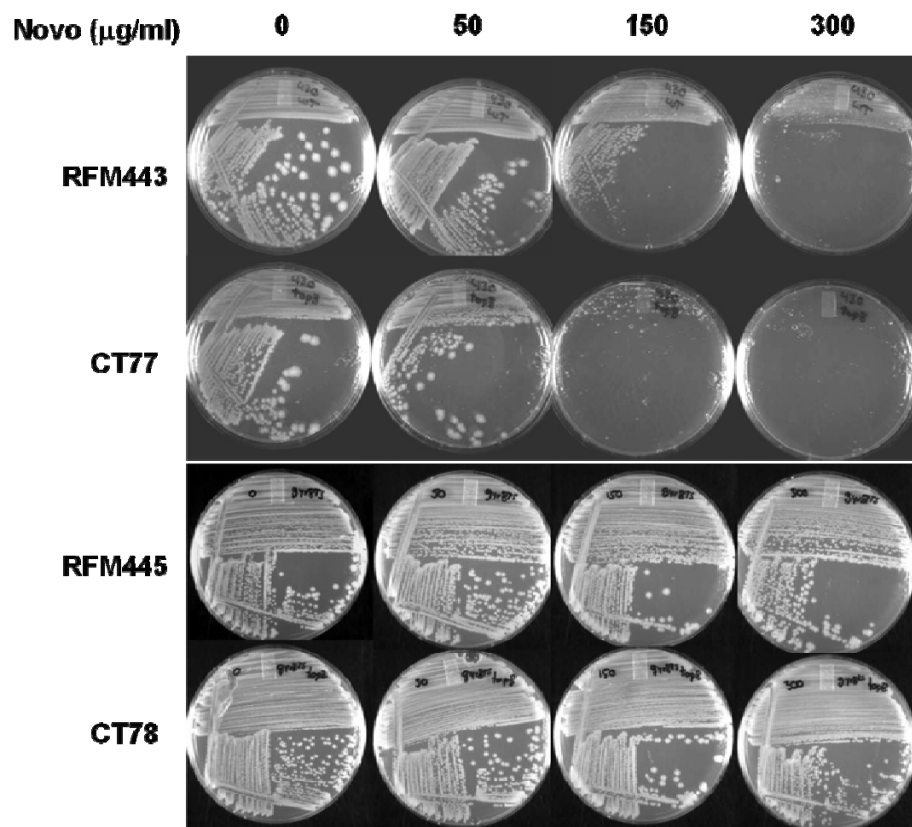


Fig 3b

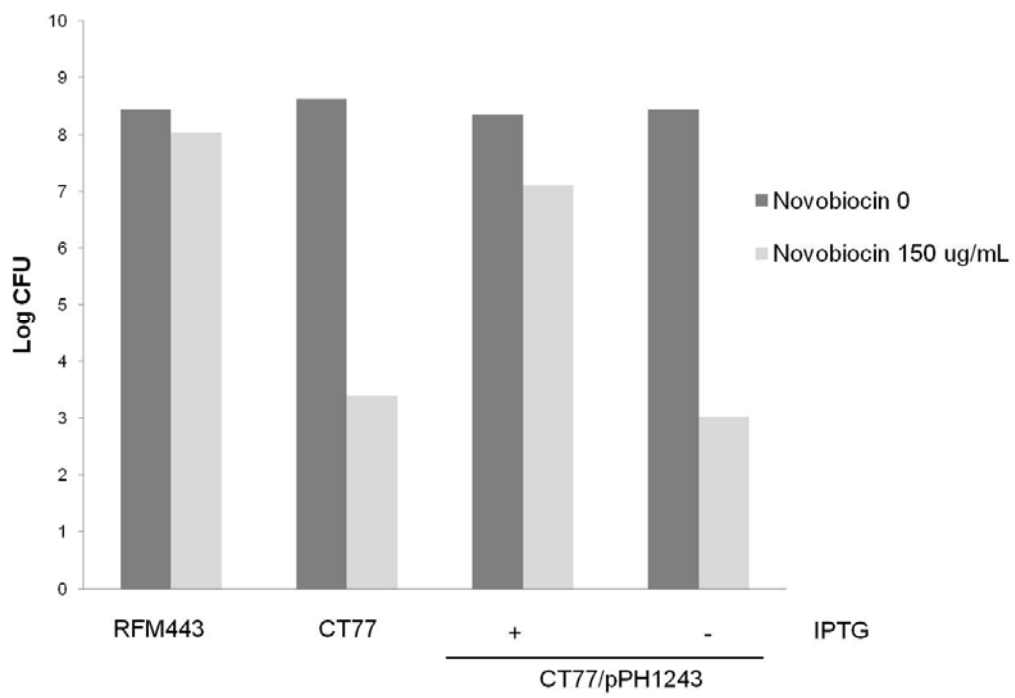


Fig. 4

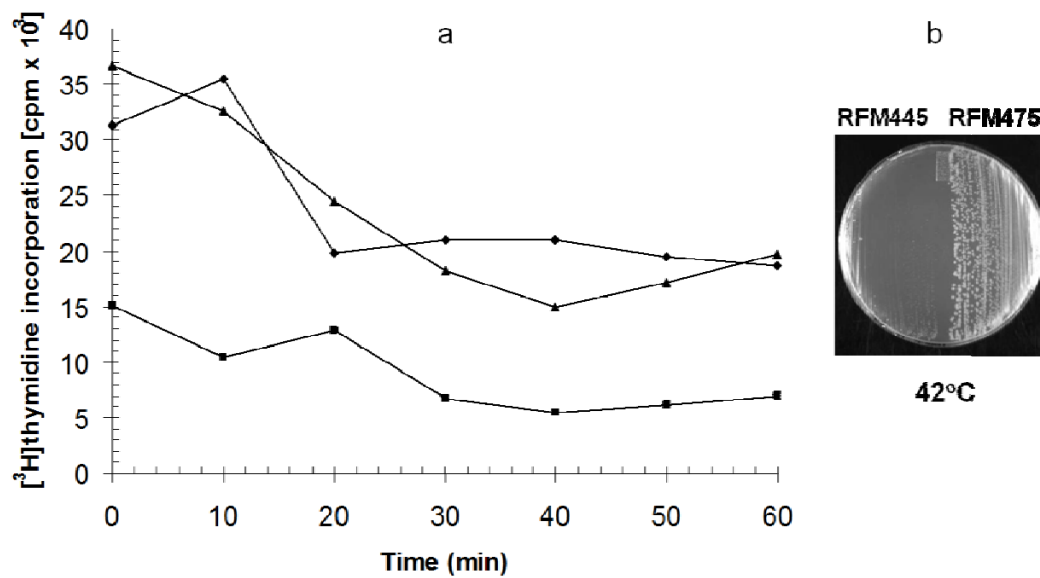


Fig. 4c

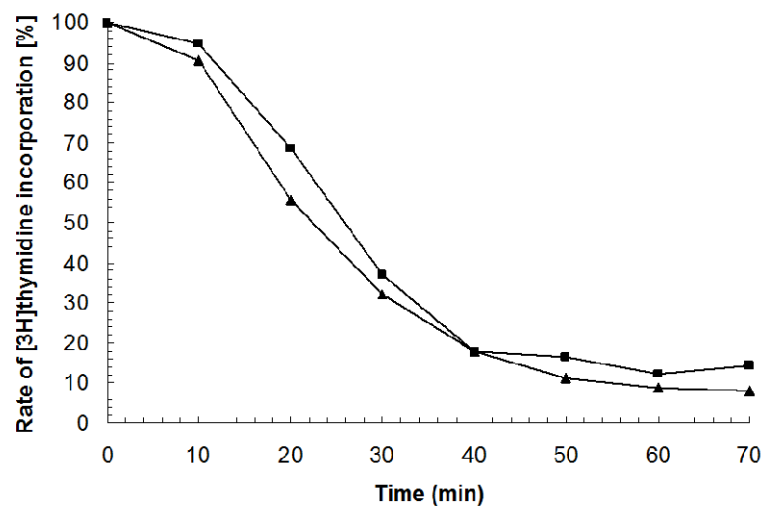


Fig. 5a

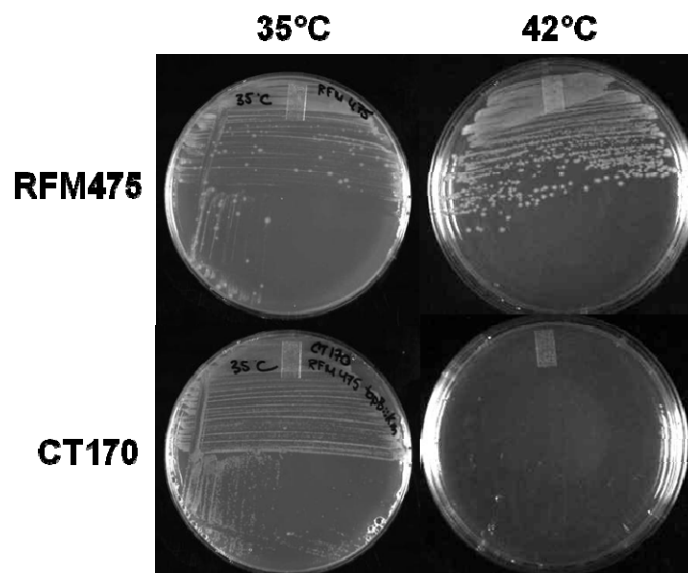


Fig. 5b

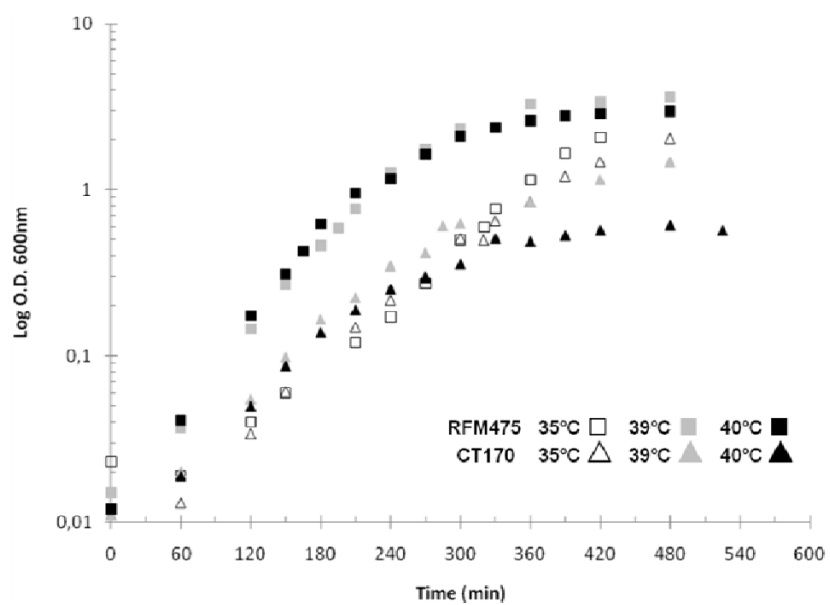


Fig. 6





		Classification (%)						
		Anucleate cells	Low DNA content	Small cells (1-2 chr/cell)	Short filaments (2-6 chr/cell)	Medium size filaments (6-14 chr/cell)	Long filaments (>14 chr/cell)	
	Temperature (°C)							
Strains	Temperature (°C)							Total
RFM475	35	0.1	N/A	93.5	6.2	0.4	0	812
	37	0.1	0	91.8	7.8	0.4	0	832
	39	27.1	0.8	34.5	34.5	3.1	0.1	772
	40	40.2	N/A	13.7	38.0	7.0	1.1	358
CT170	35	2.6	N/A	60.5	20.0	13.0	3.8	499
	37	4.0	0.3	57.8	25.0	10.0	2.9	651
	39	56.2	1.3	1.9	8.4	18.6	13.4	521
	40	47.6	N/A	0.3	4.7	23.1	24.3	338

Fig. 7

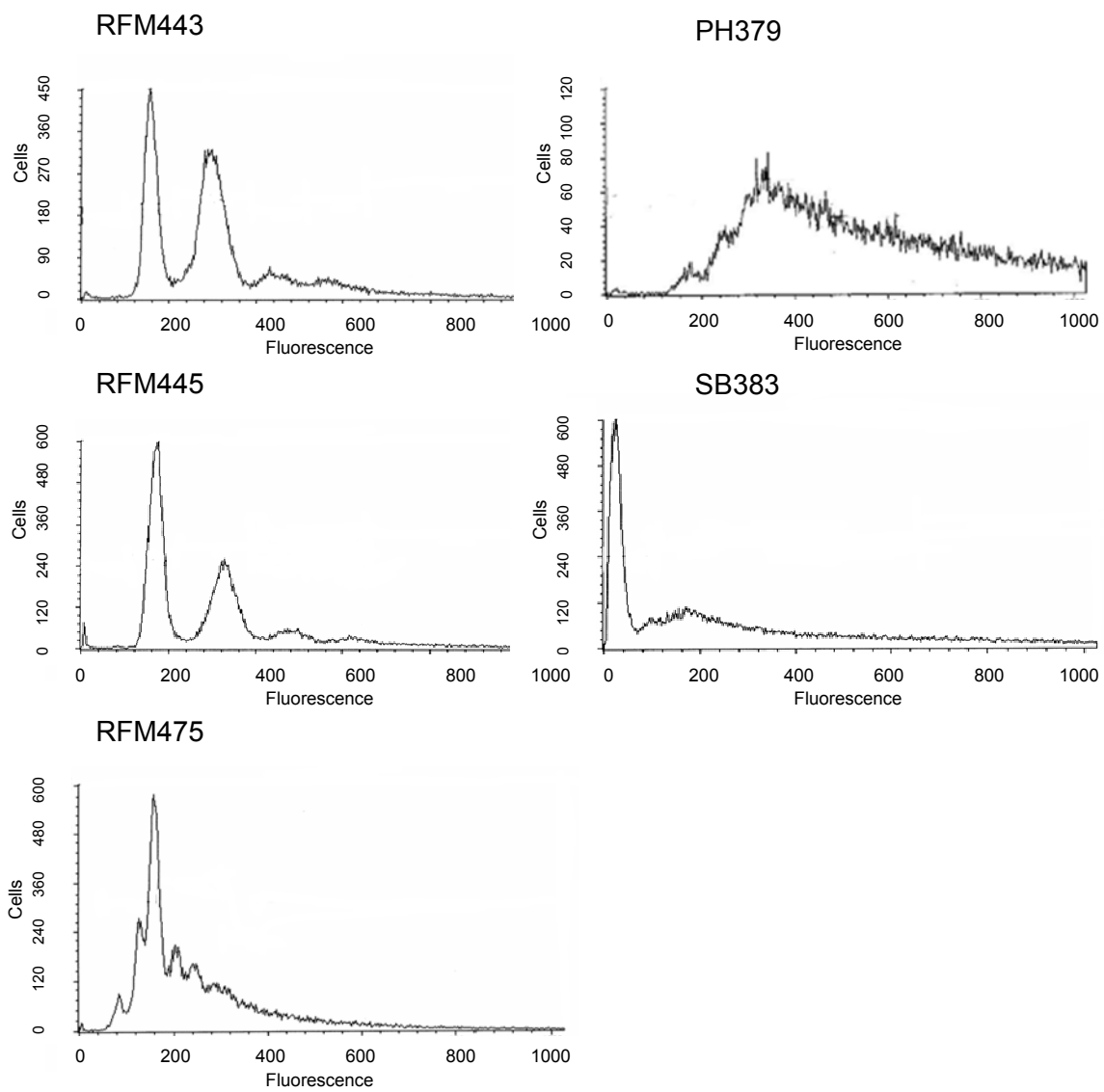


Fig. 8a

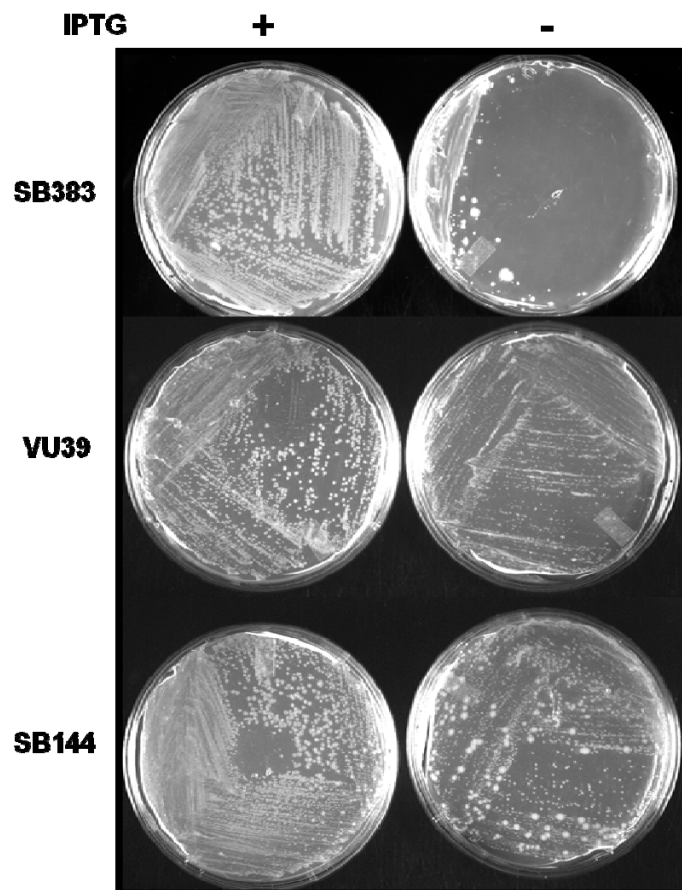
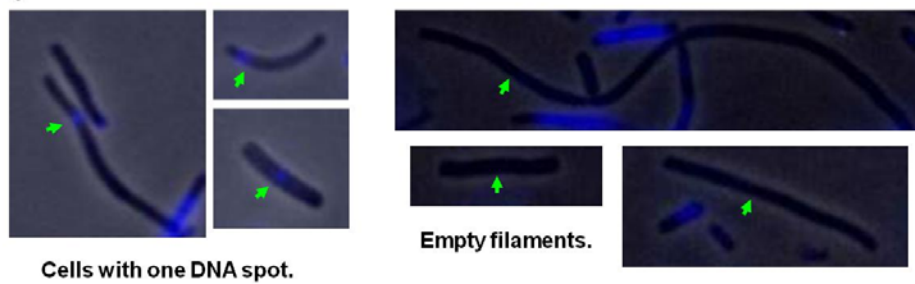


Fig. 8b

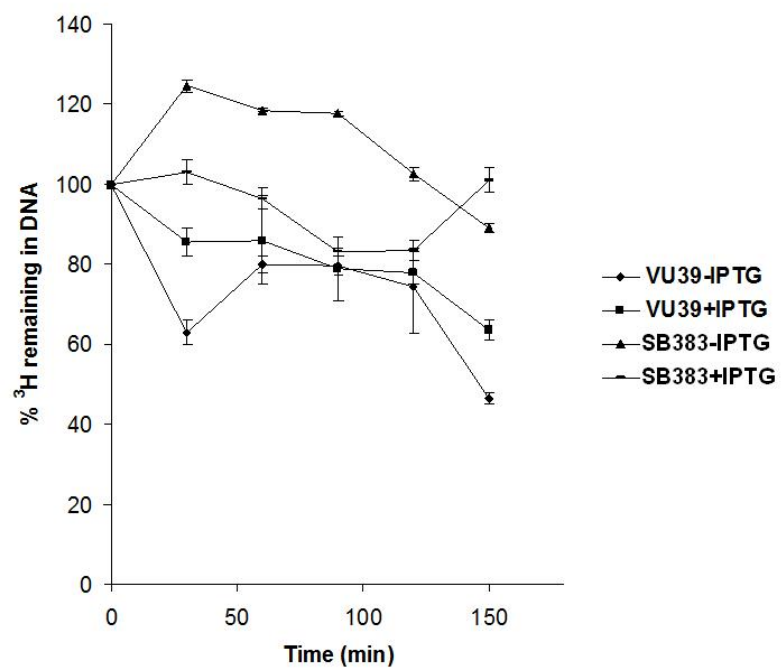


Cells with one DNA spot.

Empty filaments.

Cells with more than one DNA spot.

Fig. 8c



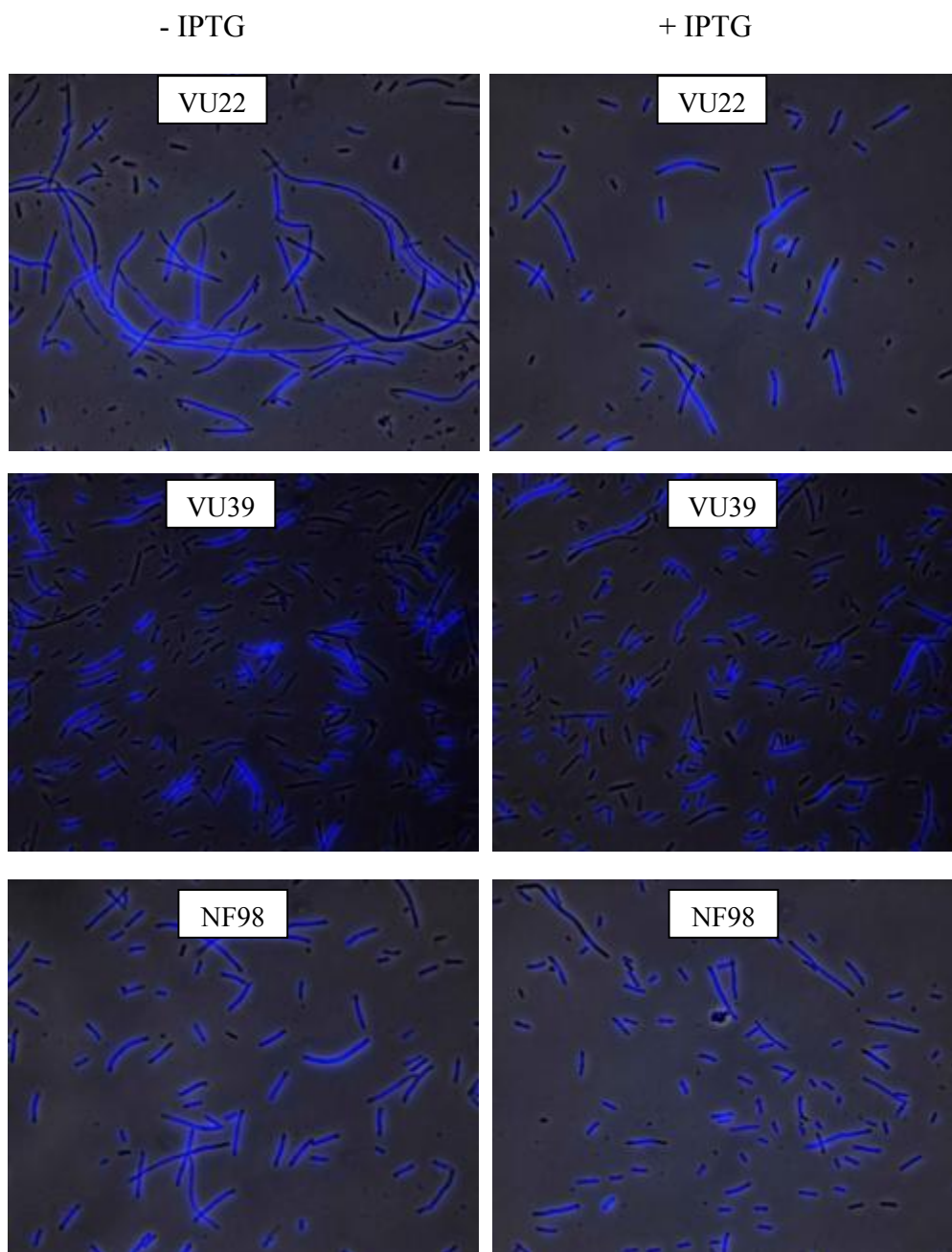


**Supporting information**

**Fig. S1.** Superimposed pictures of phase contrast and fluorescence (using Adobe Photoshop) of DAPI-stained cells from strain SB383 (*topA rnhA gyrB(Ts)*/pPH1243), one of its *recA*<sup>-</sup>-derivatives (VU39), two of its spontaneous suppressors (VU149 and VU150), and one of its *gyrB*<sup>+</sup>-derivative (NF98).

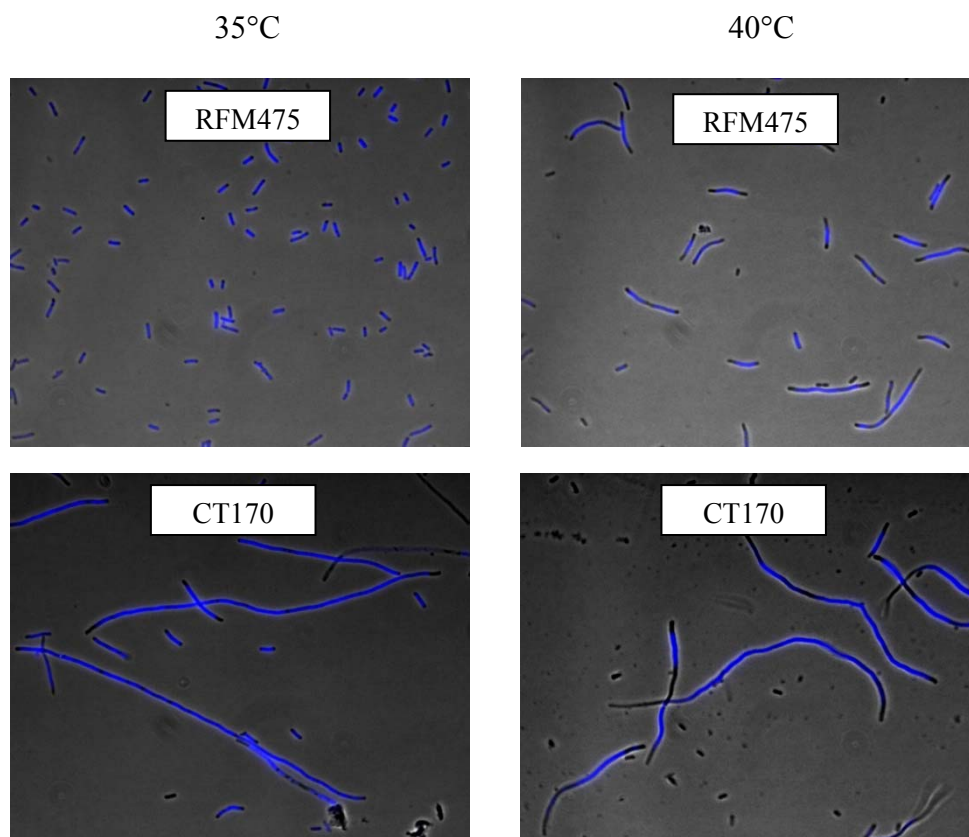
**Fig. S2.** Superimposed pictures of phase contrast and fluorescence (by using Adobe Photoshop) of DAPI-stained cells from strain RFM475 (*topA gyrB(Ts)*) and CT170 (*topA topB gyrB(Ts)*) grown at the indicated temperature (°C).

**Fig S1** Correction by *recA*<sup>-</sup> and *gyrB*<sup>+</sup> derivatives of SB383





**Fig S2** Effect of temperature on *topA gyrB*(Ts) and *topA topB gyrB*(Ts)



## 3. Discussion

### 3.1 Le triple mutant *gyrB<sup>TS</sup> topA rnhA*

#### 3.1.1 Cause de la létalité

Les défauts de ségrégation du triple mutant *gyrB<sup>TS</sup> topA rnhA* (VU22) sont différents des conséquences associées à chacune des mutations individuelles. Brièvement, l'allèle thermosensible *gyrB* permet d'inhiber la gyrase à de hautes températures (supérieures à 39 °C). À 37 °C, la gyrase est partiellement active et cela réduit sa capacité à introduire du surenroulement négatif dans l'ADN. Cette inactivation peut compromettre l'initiation de la réplication à *oriC* de même que la progression de la fourche. Un mutant pour la topoisomérase I affecte également l'initiation de la réplication, puisqu'il présente un cycle asynchrone. Enfin, sans la RNase HI, le démarrage de la réplication à *oriK* à partir de R-loops stabilisés est plus fréquent, ce qui cause également l'asynchronie du cycle cellulaire. Par ailleurs, la transcription chez un mutant *topA* génère de l'hyper-surenroulement négatif par la production de R-loops (Drolet, 2006). Considérant la stabilisation des R-loops par l'absence de la RNase HI, un double mutant *topA rnhA* devrait logiquement souffrir d'un niveau encore plus élevé d'hyper-surenroulement. Cette situation serait létale pour la cellule puisque l'on sait qu'un excès de surenroulement négatif est associé à la mort cellulaire par la dégradation de son ARN (Baaklini *et al.* 2008).

Toutefois, lorsque le triple mutant a été construit conditionnellement à l'expression de la RNase HI, il a été démontré qu'il souffre plutôt d'un manque de surenroulement (annexe, Usongo *et al.* 2008). Cette relaxation de l'ADN n'est pas attribuée à un changement dans l'expression d'aucune des topoisomérases, mais plutôt par une baisse de l'activité de la gyrase. Ainsi, la cellule possède un mécanisme pouvant inhiber la gyrase afin d'empêcher l'hyper-surenroulement. L'inhibiteur connu de la gyrase, GyrI (*sbmC*), n'est pas impliqué. Le système inhibiteur est en voie de caractérisation et il semble qu'il empêche spécifiquement l'introduction de super-tours négatifs par la gyrase (Usongo V., résultats non publiés). Puisque l'inhibiteur est induit par l'absence de la RNase HI, les conséquences de la

déplétion de la RNase HI ont été étudiées par biopuce à ADN, mais aucun changement d'expression génique n'explique cette inhibition (annexe, tableau I).

Le triple mutant *gyrB<sup>TS</sup> topA rnhA* présente également des défauts de ségrégation extrêmes : il forme de longs filaments remplis d'ADN ainsi que de nombreuses cellules sans ADN (cellules anucléées). La surproduction de la topoisomérase III corrige ces problèmes de ségrégation sans corriger le surenroulement (Usongo *et al.* 2008). Précisément, les cellules possédant des nucléoïdes séparés passent de 1,4% à 18,7% de la population suite à la correction (figure 2). La surproduction de la topo III diminue de quatre fois la quantité de longs filaments dont l'ADN est mal séparé et les cellules anucléées sont deux fois moins fréquentes. L'étude de cette souche permettra de préciser les fonctions *in vivo* des topoisomérases et de la RNase HI d'*E. coli*. Plus particulièrement, les causes de son inviabilité peuvent être révélées en définissant quelles mutations corrigent ce phénotype.

### 3.1.2 Effet de RecA

Les problèmes de ségrégation peuvent avoir des sources variées. La correction par la surproduction de la topoisomérase III (activation du plasmide pPH1243 par ajout d'IPTG) est intéressante, mais sa fonction cellulaire étant méconnue, plusieurs mécanismes peuvent être impliqués. Puisque de nombreux rôles de recombinaison pour la topo III ont été identifiés en enlevant RecA, un mutant *gyrB<sup>TS</sup> topA rnhA recA* a été construit. Cette souche peut maintenant croître sur un milieu sans IPTG, mais très lentement (figure 8A). L'ADN demeure relaxé (Usongo V., résultats non publiés). Ces cellules présentent une correction partielle, puisque très peu de longs filaments sont présents. Toutefois, énormément de cellules sans ADN ou à ADN dégradé sont formées (figure 2). La dégradation de l'ADN est causée par l'absence de RecA : les bris dans l'ADN qui ne sont pas réparés causent la fragmentation du chromosome. Enlever RecA est donc à la fois bénéfique et problématique au triple mutant. Les bris doivent être réparés, mais une quantité trop importante d'intermédiaires de recombinaison sur le chromosome peut empêcher leur séparation.

La topoisomérase III pourrait agir en aidant à résoudre les nombreux intermédiaires de recombinaison. Toutefois, cela semble peu probable puisque la

surproduction de *topB* corrige le triple mutant même lorsqu'il est *recA*. En effet, la quantité de cellules à ADN dégradé diminue de près de la moitié et plus de cellules bien partitionnées sont observées, et ce pour les deux clones étudiés (figure 2). Il est difficile d'expliquer comment la topo III pourrait résoudre les intermédiaires de recombinaison si la souche ne peut créer ces intermédiaires sans RecA.

Ce rôle pour la topo III dans la recombinaison se ferait en parallèle au système RuvABC (Lopez *et al.*, 2005). Donc, si elle contribue à résoudre les mêmes intermédiaires que RuvABC, la surproduction de ce système devrait avoir le même effet que la surproduction de la topo III. Considérant qu'aucune correction de la croissance (tableau I) ou de la ségrégation (Tanguay C., résultats non-publiés) n'a été observée par le système RuvABC, ce résultat supporte également que la résolution d'intermédiaires de recombinaison ne soit pas la source de la correction.

Néanmoins, la correction partielle par *recA* peut aussi s'expliquer par son rôle au niveau de la réponse SOS. Le triple mutant possédant l'allèle *lexA3* ne peut plus induire la réponse SOS et il présente également une correction partielle (figure 8A). Cette correction n'est pas aussi bonne que cellule obtenue en enlevant RecA. La réponse SOS ne semble donc pas directement impliquée dans les problèmes de ségrégation. L'activation de la réponse SOS augmente également le niveau d'expression de RecA. Or, cela pourrait accroître le nombre d'intermédiaires de recombinaison présents. Nous savons effectivement que la réponse SOS est induite chez le triple mutant (résultats non-publiés). Il est donc probable que la correction observée soit causée par une baisse du niveau de RecA et donc une diminution du nombre d'intermédiaires de recombinaison présents. D'autre part, RecA est nécessaire au cSDR et donc un accroissement de son expression pourrait faciliter l'initiation à *oriK* et augmenter la fréquence des collisions de fourche. Ce mécanisme de réponse au stress induit également l'expression de *sfiA* qui retarde la division cellulaire. Il est possible d'observer une légère diminution de la filamentation chez le triple mutant *sfiA*; toutefois, les défauts de ségrégation demeurent présents (Tanguay C., résultats non-publiés). La réponse SOS augmente donc légèrement la filamentation, mais n'est pas la cause des défauts de ségrégation.

### 3.1.3 Suppresseurs spontanés

L'isolement de supresseurs spontanés d'un phénotype est une méthode classique pour identifier les partenaires responsables des observations. Après une nuit de croissance sans IPTG, le triple mutant forme quelques plus grosses colonies qui peuvent très bien croître suite à leur isolement sur un milieu exempt d'IPTG (figure 1A). Deux de ces supresseurs ont été étudiés plus en détails, soit VU149 et VU150.

Les catégories de cellules retrouvées suite à une croissance sans IPTG sont similaires à celles obtenues chez le triple mutant de départ (VU22) lorsqu'il est corrigé par *topB* (figure 2), c'est-à-dire qu'il y a présence de cellules dont les nucléoïdes sont bien ségrégués et qu'il y a peu de longs filaments. Les niveaux d'expression de *topB* sont toujours régulés normalement chez ces supresseurs (figure 1B) et la dérégulation du plasmide n'est donc pas la source de cette correction. La topoisomérase III a encore un effet bénéfique sur ces souches en diminuant de moitié les cellules anucléées, les cellules à ADN dégradé et également les longs filaments pour les deux supresseurs (figure 2).

De plus, le surenroulement de ces deux souches est corrigé, de même que l'activité de la gyrase (figure 1D). Cette corrélation entre l'activité de surenroulement de la gyrase et la correction du triple mutant est très intéressante. La cause exacte de l'augmentation du surenroulement de ces souches n'est pas encore identifiée, mais le séquençage des allèles *gyrA* et *gyrB* démontre qu'aucune mutation additionnelle n'est retrouvée dans la gyrase (résultat non-montré).

### 3.1.4 Introduction de l'allèle *gyrB*<sup>+</sup>

Afin d'approfondir la relation entre l'activité de la gyrase et la sévérité des défauts de ségrégation, nous avons réintroduit un allèle *gyrB* de type sauvage au triple mutant. La souche VU22-*gyrB*<sup>+</sup> présente la meilleure correction obtenue jusqu'à présent. Le surenroulement *in vivo* est rétabli et l'activité *in vitro* de la gyrase est parfaite (figure 1D). Également, la ségrégation est corrigée. La correction est meilleure que celle obtenue avec les supresseurs, puisque les cellules anucléées ou possédant de l'ADN dégradé sont presque absentes (figure 2). La surproduction de la topoisomérase III a un effet bénéfique sur la croissance de cette souche, mais cet effet



n'est pas ou très peu retrouvé sur la correction de la ségrégation. Donc, si on compare le triple mutant VU22 à ses deux supprimeurs (VU149, VU150) et à sa version *gyrB*<sup>+</sup>, la topoisomérase III corrige surtout lorsque l'activité de la gyrase n'est pas optimale et la gravité des défauts de ségrégation corrèle avec le niveau de surenroulement *in vivo*.

## 3.2 Rôle de la topoisomérase III

### 3.2.1 Site d'action

Donc, à quel niveau la topoisomérase III agit-elle pour corriger la ségrégation du triple mutant? Nous savons que celle-ci n'a pas d'effet sur le surenroulement global. Par sa capacité à corriger le triple mutant même lorsque celui-ci est *recA* et par l'absence d'effet du système RuvABC sur la correction, un rôle pour la topo III au niveau de la résolution d'intermédiaires de recombinaison semble peu probable (figure 2, tableau I).

Cette enzyme nécessite de l'ADNsb pour son action, alors ses substrats possibles *in vivo* sont limités. Nous savons que VU22 possède des R-loops stables et que les R-loops correspondent à un bon substrat pour la topo III (Broccoli *et al.*, 2000). Si cette topoisomérase de type IA agit aux R-loops, sa surproduction devrait diminuer le cSDR et l'asynchronie associée. Rappelons qu'une souche *gyrB*<sup>TS</sup> *topA* est asynchrone (figure 7) : en cytométrie, il est possible d'observer des pics qui ne correspondent pas à 2<sup>n</sup> (où n = nombre d'origines). Les cellules ont donc 1, 2, 3, 4 ou 5 chromosomes par exemple. La cellule parvient tout de même à compléter les rondes de réplication entamées. Par ailleurs, un mutant *rnhA* est asynchrone, mais les cycles ne sont pas complétés et la population de cellules est très hétérogène. C'est donc sans surprise que le triple mutant *gyrB*<sup>TS</sup> *topA* *rnhA* soit également asynchrone (figure 6). D'une manière semblable au mutant *rnhA*, VU22 ne parvient pas à compléter sa réplication, possiblement en raison du nombre important de fourches voyageant sur l'ADN sans synchronisme. Suivant sa correction par la topo III, le synchronisme n'est pas rétabli chez le triple mutant (figure 7). Également, un R-loop stable pourrait devenir une source de blocage pour une fourche de réplication et pourrait expliquer pourquoi la réplication n'est pas bien complétée chez cette souche. La surproduction

de *topB* ne permet pas non plus la complétion de l'élongation. Un rôle au niveau des R-loops semble donc peu probable. Par ailleurs, l'asynchronie de cette souche ainsi que sa difficulté à compléter la réplication viennent expliquer pourquoi la délétion de RecA n'est que partiellement favorable : la réplication est difficilement complétée et causera de nombreuses structures problématiques pour lesquelles la recombinaison sera nécessaire.

De l'ADN simple brin est également retrouvé aux fragments d'Okazaki ainsi que derrière la fourche de réplication. Les possibilités d'action au niveau de la réplication seront abordées dans la section suivante. Brièvement, il a été démontré dans la littérature que la topoisomérase III peut permettre la progression de la réplication (Hiasa et Marians, 1994). Également, le substrat d'ADNsb pour la topo III pourrait être fourni par une hélicase. En ce sens, l'action jumelée de la topo III et de l'hélicase RecQ permet de résoudre des intermédiaires de réplication tardifs (LRI) retrouvés à la fin de la réplication, lors de la convergence de deux fourches (Suski et Marians, 2008).

### 3.2.2 Lien avec la gyrase

Ainsi, la souche étudiée peut être corrigée par la surproduction de la topoisomérase III ainsi que par la restauration de l'activité de la gyrase. Ces faits suggèrent que la topoisomérase III soit particulièrement nécessaire lorsque la gyrase n'est pas optimale. Nous avons testé directement la capacité d'une souche *topB* à supporter l'inactivation de la gyrase par l'ajout de novobiocine. Lorsqu'une concentration de 150 µg/mL de l'antibiotique est ajoutée, la croissance de la souche *topB* est diminuée par rapport à une souche de type sauvage (figure 3-AB). De plus, cette sensibilité est réversible si *topB* est exprimé sur un plasmide, démontrant que l'effet n'est pas causé par un gène différent. La novobiocine inhibe principalement la gyrase, mais elle affecte également la topoisomérase IV. Afin de confirmer la cible de la novobiocine à 150 µg/mL, un allèle *gyrB* résistant à l'antibiotique a été utilisé et a confirmé l'implication de la gyrase à cette concentration : la topo IV est inhibée à de plus hautes concentrations (annexe, figure 1). Les résultats avec le triple mutant ont suggéré une relation avec la gyrase, mais dans un contexte où c'est la surproduction

de la topo III qui est nécessaire. Le test de sensibilité à la novobiocine permet de démontrer qu'un niveau sauvage de topo III est requis pour supporter plus facilement l'inactivation de la gyrase. Considérant le faible nombre de copies de ce gène dans la cellule et le peu de phénotypes associés à la délétion de *topB*, la relation entre la topoisomérase III et la gyrase *in vivo* est très pertinente.

Maintenant, à quel niveau les activités de la gyrase et de la topo III peuvent-elles être reliées? Nous savons que le rôle principal de la gyrase est d'introduire du surenroulement négatif dans l'ADN, ce qui maintient le niveau de surenroulement global du chromosome et facilite l'ouverture du duplex à *oriC*. Une topo de type IA ne peut introduire de super-tours négatifs et un rôle à ces niveaux est donc exclu. Un autre rôle important de la gyrase est de permettre la progression de la réplication en enlevant l'accumulation de surenroulement positif devant la fourche.

À ce sujet, l'inactivation complète de la gyrase n'est pas viable pour une cellule. Par exemple, la croissance d'une souche *gyrB<sup>TS</sup>* à 42 °C donne des cellules avec des défauts de partition extrêmes : les chromosomes ne peuvent ségréger aux pôles et l'ADN demeure au centre de la cellule et la déforme (annexe, figure 2B). Des cellules anucléées sont également produites lorsque ces cellules se divisent malgré l'absence d'ADN dans certaines régions. Ces défauts de partitions sont corrigés en surproduisant la topoisomérase III à un très haut niveau, en quantité supérieure à celle utilisée pour corriger le triple mutant VU22 (figure 2AB). À ce moment, la topo III corrige la ségrégation : les cellules ne sont plus bombées et la production de cellules anucléées cesse. Malgré cela, la croissance n'est pas rétablie et après trois jours d'incubation, seulement une légère croissance est observée. Cela suggère donc qu'à de forts niveaux, la topo III peut permettre la ségrégation des chromosomes, mais qu'elle ne peut remplacer tous les rôles de la gyrase. Deux explications sont possibles. D'une part, lorsqu'une très forte concentration de topo III est présente, celle-ci peut compenser pour l'inhibition de la topo IV et elle-même séparer les chromosomes. Considérant le faible niveau de topo III dans la cellule, une action à ce niveau est improbable dans une situation courante et ce rôle est probablement uniquement valable dans des conditions extrêmes *in vitro*. D'autre part, il est possible

que la topoisomérase III sépare les chromosomes au fur et à mesure de la réplication par son action au niveau des précaténanes. Ce mode d'action permettrait de pallier à l'incapacité de la gyrase à supporter la réplication. Les précaténanes sont peu présents *in vivo*, mais dans une situation particulière où la gyrase n'est pas suffisante, une action à ce niveau est plus vraisemblable.

Le second rôle proposé pour la topoisomérase III au niveau des LRI peut-il également expliquer une relation entre la gyrase et la topo III? À prime abord, les deux voies de résolutions des intermédiaires de réplication tardifs semblent séparées. Dans la première voie de résolution des LRI, la gyrase accomplit son rôle classique en permettant l'avancement de la fourche et lorsque l'espace devient trop restreint pour son action, la complétion de la réplication est associée à la formation de caténanes qui seront séparés par la topo IV. La seconde voie de résolution prévoit que la structure LRI soit résolue par la topo III, RecQ et SSB pour former deux chromosomes séparés avant la complétion de la réplication. Tel que discuté au paragraphe précédent, dans une situation où la gyrase n'est pas optimale, la seconde voie sera privilégiée et la topo III sera nécessaire pour supporter la réplication. D'autant plus que dans un contexte de cycle cellulaire asynchrone, des fourches de réplifications pourraient converger ailleurs qu'à *oriC*. La quantité importante de réplication en cours simultanément additionnée à une gyrase inadéquate rendra la topoisomérase III indispensable.

### **3.3 Le triple mutant *gyrB<sup>TS</sup> topA topB***

#### **3.3.1 Conséquences de la mutation *gyrB<sup>TS</sup>***

Ainsi, une souche *topB* supporte plus difficilement l'inactivation de la gyrase par la novobiocine. Nous avons tenté de répliquer ce résultat par l'utilisation de l'allèle thermosensible, mais sans succès. Une souche *gyrB<sup>TS</sup> topB* est tout aussi sensible aux hautes températures qu'une souche *gyrB<sup>TS</sup>* seule (annexe, figure 3). Nous avons donc étudié plus en détails les conséquences de la mutation *gyrB<sup>TS</sup>* afin de comprendre à quel niveau l'action de la topo III est nécessaire.

La capacité de réplication de la souche a été mesurée par l'incorporation de thymine radioactive (« *pulse-labelling* ») : il est possible de voir qu'effectivement, le

taux de réplication d'une gyrase partiellement active (37 °C) est diminué (figure 4). L'ajout de chloramphénicol permet d'observer la capacité à poursuivre la réplication suite à l'initiation, puisque seule l'initiation est inhibée par l'antibiotique. Dans ce cas-ci, nous observons que c'est précisément l'étape d'initiation qui fait défaut. La présence de pics définis en cytométrie en flux permet également de confirmer que la réplication est complétée chez la souche *gyrB<sup>TS</sup>*. Toutefois, une plus faible proportion de la population possède quatre chromosomes par rapport à une souche sauvage (figure 7), réaffirmant que moins d'initiation a eu lieu. Considérant que l'allèle thermosensible cause surtout une baisse du taux de réplication à cause d'un défaut au niveau de l'initiation, il est normal que la délétion de la topo III n'accentue pas ce défaut puisqu'elle n'est pas associée à cette action. Il est même probable qu'une baisse de synthèse d'ADN soit bénéfique à la cellule sans *topB* afin de diminuer le nombre de fourches voyageant sur l'ADN.

### 3.3.2 Correction de *gyrB<sup>TS</sup>* par *topA*

Le défaut d'initiation du *gyrB<sup>TS</sup>* est corrigé par l'absence de la seconde topoisomérase de type IA (*gyrB<sup>TS</sup> topA*) (figure 5A). Ce résultat suggère que la topoisomérase I est normalement requise pour contrôler l'initiation à *oriC*. Lorsque la gyrase devient moins compétente pour initier à un taux normal, enlever la topo I facilite l'ouverture du duplex. Par contre, la réplication devient asynchrone (figure 7). Cet effet se visualise également par la croissance à une haute température. Normalement, à 42 °C, la *gyrB<sup>TS</sup>* n'est pas viable (figure 4B). Toutefois, il est possible d'observer l'excellente croissance de *gyrB<sup>TS</sup> topA* à cette température.

Également, le défaut d'initiation de la souche explique pourquoi la surproduction de la topo III corrige la ségrégation de cette souche à une haute température, sans corriger la croissance (figure 5AB, figure 6). L'effet létal pour la cellule est associé à l'action de la gyrase pour l'initiation et non l'élongation. Cela confirme également l'absence d'effet de la topo III sur l'initiation. Puisque nous avons maintenant une souche avec une gyrase thermosensible dont les défauts d'initiation sont corrigés, nous pouvons désormais étudier directement les conséquences de l'absence de *topB* sur l'élongation de la réplication.

### 3.3.2 Thermo-sensibilité du triple mutant

C'est dans cette optique que nous avons construit le triple mutant *gyrB<sup>TS</sup> topA topB*. L'étude d'un mutant *topA topB* dans la littérature s'est fait conditionnellement à l'expression de *topB* sur un plasmide : les auteurs concluent qu'il est impossible d'enlever les deux topoisomérases de type IA à la cellule et donc qu'au moins une des deux topos est nécessaire à la ségrégation (Zhu *et al.*, 2001). Après optimisation de la technique de transduction, un triple mutant *gyrB<sup>TS</sup> topA topB* a été obtenu sans l'utilisation d'un plasmide. Le double mutant de Zhu *et al.* contient également une mutation dans la gyrase afin de compenser pour la délétion de la topo I, mais celle-ci est différente de l'allèle thermosensible que nous avons utilisée. Il est possible que cette mutation de la gyrase ait un effet différent de la *gyrB<sup>TS</sup>* et que leur gyrase soit trop affaiblie pour pouvoir retirer la topo III. Malgré tout, les phénotypes observés chez ces deux souches sont semblables : elles forment de longs filaments dont les nucléoïdes sont mal ségrégués.

L'avantage de ce triple mutant est que le degré d'activité de la gyrase peut être modifié en variant la température d'incubation. Nous savons que *topA* corrige l'initiation de la souche *gyrB<sup>TS</sup>* et que le double mutant est alors viable à de hautes températures (figure 4B). Si la topo III assiste lors de l'élongation de la réplication, l'enlever devrait être néfaste à de hautes températures. On voit effectivement que le triple mutant a plus de difficulté à croître à une haute température (figure 5A). Une corrélation parfaite est obtenue entre l'augmentation de la température et l'inhibition de la croissance chez ce triple mutant (figure 5B). La souche *gyrB<sup>TS</sup> topA* est composée de plus de 80% de cellules à ADN bien séparé à des températures entre 28 °C et 37 °C (figure 6). À 39°C, les types de cellules retrouvées varient : un plus grand nombre de courts filaments apparaît, et un quart des cellules ne contient pas d'ADN. Toutefois, plus d'un tiers des cellules démontrent une ségrégation correcte. Pour le triple mutant *gyrB<sup>TS</sup> topA topB*, on observe déjà à de basses températures que l'inactivation des deux topos de type IA est problématique : seulement 60% des cellules sont bien séparées. À 39 °C, toutes les cellules comptées présentent des défauts de ségrégation : 56% des cellules sont anucléées et le reste des cellules forment des filaments de tailles variables. La gravité des défauts de ségrégation

augmente graduellement avec la température : l'allongement des filaments et l'accroissement du nombre de cellules anucléées suit le passage de la température de 28 °C à 40 °C. Donc, si la gyrase n'est que peu inhibée (*gyrB<sup>TS</sup>* à 37 °C), l'absence de *topB* est tolérée puisque son initiation fait défaut et que peu de réplication est en cours. Toutefois, si l'initiation est corrigée (*topA*), la quantité de réplication augmente et l'absence de *topB* devient problématique. Il faut donc que la souche soit également *topA* pour qu'il y ait un effet chez la souche *gyrB<sup>TS</sup> topB*.

Si l'on applique cette logique au triple mutant VU22 (*gyrB<sup>TS</sup> topA rnhA*), la production de l'inhibiteur affaiblie également la gyrase. Toutefois, grâce à son taux d'initiation diminué, cela est toléré. Si on retire la topoisomérase I à la cellule dont la gyrase est à la fois thermosensible et inhibée, le niveau sauvage de topoisomérase III n'est plus suffisant et il faut donc surproduire *topB* pour permettre la croissance.

Il est mentionné sous forme de résultats non publiés qu'un mutant *topA recQ* présente les mêmes défauts de ségrégation qu'un mutant *topA topB* (Zhu *et al.*, 2001). Toutefois, l'excellente croissance d'une souche *gyrB<sup>TS</sup> topA recQ* que nous avons construite ne réplique pas ces observations (annexe, figure 4). Encore une fois, une différence de génotype empêche une comparaison directe des résultats. Également, un mutant *recQ* ne présente pas de sensibilité accrue à la novobiocine (annexe, figure 5). Cela suggère donc que RecQ agisse à une étape précédente à l'action de la topo III.

### **3.4 Rôle des topoisomérases de type IA dans la ségrégation des chromosomes**

Retirer les deux topoisomérases de type IA à *Escherichia coli* lui occasionne effectivement des défauts de ségrégation. Toutefois, il appert que les deux topoisomérases agissent à des niveaux différents de la réplication et qu'elles n'ont pas de rôle commun. La topoisomérase I relaxe l'ADN, une action à l'opposé de l'introduction de surenroulement négatif par la gyrase. Justement, il est difficile de l'enlever sans que des mutations diminuant l'activité de la gyrase apparaissent. C'est pourquoi ces enzymes collaborent pour contrôler le niveau de surenroulement global. Cette coopération offre également un accès pour un niveau de contrôle supplémentaire sur un mécanisme déjà fortement régulé : l'initiation de la réplication.

L'implication de la topoisomérase I pour contrôler le taux d'initiation à *oriC* est supportée par plusieurs observations. Premièrement, la délétion de *topA* rend le cycle cellulaire asynchrone. Deuxièmement, cette même mutation peut corriger spécifiquement le défaut d'initiation d'une gyrase partiellement active (*gyrB<sup>TS</sup>*). Ce rôle serait possiblement médié par l'ARN polymérase. En effet, la topoisomérase I interagit avec l'ARN polymérase (Cheng *et al.*, 2003). De prime abord, cette association permet de favoriser le contrôle du surenroulement lié à la transcription. Une activité de transcription est également nécessaire pour l'initiation de la réplication. À la lumière de cette hypothèse, l'action de transcription pourrait permettre le contact de la topoisomérase I à *oriC* et assurer ainsi à la cellule de maintenir le taux d'initiation à un seuil désiré.

En plus de faciliter l'initiation, la gyrase assure la progression de la fourche de réplication. Ce rôle est associé à l'activité de la topoisomérase III. D'abord, il est plus difficile pour une souche de supporter l'inactivation de la gyrase lorsque *topB* est absent. De plus, cette relation s'observe uniquement si l'initiation de la réplication est rétablie, et donc cette relation entre la topo III et la gyrase est spécifique à une étape ultérieure à l'initiation. Ensuite, l'inactivation progressive de la gyrase thermosensible par l'augmentation de la température corrèle parfaitement avec l'ampleur des défauts de ségrégation observés chez un mutant pour la topoisomérase III. Finalement, les défauts de ségrégation causés par une gyrase inhibée sont corrigés en surproduisant *topB* à de très fort niveau, sans que cela ne corrige la croissance.

Le modèle que nous suggérons propose que la topoisomérase I agisse au début du cycle et que la topoisomérase III soit nécessaire en fin de cycle. La topoisomérase III est une enzyme peu abondante et sa délétion se fait presque sans conséquences pour la cellule. Il faut des conditions spécifiques pour que son absence soit remarquée et que son action devienne indispensable. *Escherichia coli* possède donc plusieurs voies pouvant mener à la complétion de la réplication ainsi qu'à la séparation des chromosomes. La situation habituelle nécessite l'action des topoisomérases de type IIA : la gyrase pour l'élongation de la réplication et la topo IV pour la décaténation. Parfois, la topoisomérase III pourrait contribuer lors de la terminaison afin de faciliter



le déroulement de l'ADN compris dans l'espace restreint entre deux fourches. Cependant, en l'absence de *topB*, la cellule utilise uniquement la première voie.

Maintenant, si la gyrase est moins apte à poursuivre la réplication, par exemple parce qu'elle est ciblée par un inhibiteur ou parce qu'elle est thermosensible, la conversion de super-tours positifs en précaténanes serait plus fréquente et la topo III serait donc utilisée plus couramment par la cellule. Toutefois, puisque l'initiation de la réplication sera également ralentie, la délétion de *topB* pourra tout de même être tolérée par la cellule. Si en plus de l'inactivation partielle de la gyrase, une seconde mutation vient augmenter le taux de réplication (par exemple, *rnhA* ou *topA*), le nombre de fourche voyageant sur l'ADN augmentera, de même que la nécessité de la topoisomérase III.

Avec de nombreuses fourches de réplication en déplacement et une gyrase peu apte à contrôler ce trafic, les collisions de fourches ainsi que des structures de réplication problématiques seraient fréquentes. Le système de recombinaison formera alors de nombreux intermédiaires de recombinaison pour réparer ces structures. Le déclenchement de la réponse SOS amplifiera ce phénomène et de l'hyper-recombinaison aura lieu. La cellule a besoin de ce système de réparation, mais la haute fréquence de recombinaison sature la capacité de la cellule à résoudre les intermédiaires et la séparation des chromosomes en sera retardée, formant des filaments.

À ce moment, un niveau sauvage de *topB* est nécessaire et la correction des défauts de ségrégation nécessite sa surproduction. La topoisomérase III pourrait permettre la séparation des chromosomes selon la deuxième voie, par une action au niveau des précaténanes. Également, l'enzyme pourra participer à la résolution des intermédiaires de réplication tardifs présents dans la région *Ter* de même qu'ailleurs sur le chromosome suite à la convergence de deux fourches de réplication.

## 4. Perspectives

La relation entre les topoisomérases de type IA et la gyrase s'est avéré une grande source d'information sur le rôle de ces topoisomérases dans la ségrégation des chromosomes. Les prochaines avenues de recherche sur ce sujet devraient permettre de confirmer les rôles trouvés ainsi que de préciser les voies utilisées ainsi que les partenaires impliqués. Il sera intéressant d'identifier les suppresseurs de VU149 et VU150. Bien que la gyrase ne soit pas la cible de mutations dans ces souches, la corrélation de l'amélioration de son activité et de la croissance démontre que, directement ou pas, son activité de surenroulement est modifiée. Une hypothèse attirante est que l'inhibiteur de gyrase soit muté. Cela permettrait d'isoler l'inhibiteur et il s'agit donc d'une des stratégies utilisées actuellement afin d'identifier le mécanisme inhibiteur.

Les résultats de biopuces à ADN n'ont pas révélé l'inhibiteur, mais nous avons observé que certaines régions du chromosome semblent régulées par le niveau de RNase HI présent. Parmi celles-ci, la région contenant l'opéron *paaA*, codant pour une oxygénase, était particulièrement prometteuse, puisque son expression corrèle avec le niveau d'expression de *rnhA*. Toutefois, cette amplification génique n'a pas été retrouvée au niveau de l'ADN (annexe, figure 6) et la raison de l'amplification demeure inconnue. Il serait logique de penser que par la RNase HI et le cSDR, la cellule pourrait contrôler l'amplification de certaines régions de son chromosome.

Nos résultats démontrent un rôle pour la topoisomérase III afin de permettre la ségrégation des chromosomes lorsque l'activité de la gyrase n'est pas maximale. C'est dans cette optique que nous désirons vérifier si *topB* est régulé selon certaines conditions de croissance, comme lors d'une baisse de surenroulement ou suite à l'inactivation de la gyrase. Également, nous avons obtenu des résultats préliminaires avec RecQ selon lesquels l'hélicase agirait préalablement à la topo III. Il serait intéressant de vérifier dans quelles circonstances la topo III peut encore corriger, par exemple suite à la délétion de *recQ* ou de *ssb*. Par ailleurs, la croissance du triple

mutant *gyrB*<sup>TS</sup> *topA topB* mène également à la croissance de colonies révertantes et l'isolement et l'étude de ces suppresseurs pourrait s'avérer une piste à suivre.

Nous désirons également étudier plus en détails les défauts de ségrégation des diverses souches utilisées. La visualisation de l'ADN par coloration au DAPI combinée à la microscopie en contraste de phase est une technique très instructive sur la localisation des nucléoïdes dans la cellule. Il serait également possible d'utiliser des sondes fluorescentes spécifiques à certains gènes afin de localiser des séquences d'ADN dans les cellules. Par exemple, par FISH («*fluorescence in situ hybridization*»), nous pourrions suivre la localisation et le nombre de régions *oriC* et *Ter*.

La découverte d'*Escherichia coli* par Théodore Escherich a eu lieu il y a 125 ans et pourtant, ce modèle est toujours une source intarissable de renseignements. Le peu de phénotypes associés à la délétion de la topoisomérase III est loin des lourdes conséquences associées à l'absence des topoisomérases III eucaryotes et de l'instabilité génique associée. Pourtant, en étant une voie de secours pour assurer la ségrégation, cette topoisomérase de type IA contribue à éviter la perte de matériel génétique. La poursuite de ce projet devrait amener des réponses supplémentaires sur les mécanismes impliqués, particulièrement au niveau des partenaires des topos de type IA ainsi que du site d'action précis de la topoisomérase III.

## 5. Sources documentaires

- Adachi, S. & S. Hiraga, (2003) Mutants suppressing novobiocin hypersensitivity of a *mukB* null mutation. *J Bacteriol* **185**: 3690-3695.
- Adachi, S., M. Kohiyama, T. Onogi & S. Hiraga, (2005) Localization of replication forks in wild-type and *mukB* mutant cells of *Escherichia coli*. *Mol Genet Genomics* **274**: 264-271.
- Adams, D. E., E. M. Shekhtman, E. L. Zechiedrich, M. B. Schmid & N. R. Cozzarelli, (1992) The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell* **71**: 277-288.
- Aguilera, A. & B. Gomez-Gonzalez, (2008) Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* **9**: 204-217.
- Ali Azam, T., A. Iwata, A. Nishimura, S. Ueda & A. Ishihama, (1999) Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J Bacteriol* **181**: 6361-6370.
- Atkinson, J. & P. McGlynn, (2009) Replication fork reversal and the maintenance of genome stability. *Nucleic Acids Res* **37**: 3475-3492.
- Atlung, T. & F. G. Hansen, (2002) Effect of different concentrations of H-NS protein on chromosome replication and the cell cycle in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 1843-1850.
- Aussel, L., F. X. Barre, M. Aroyo, A. Stasiak, A. Z. Stasiak & D. Sherratt, (2002) FtsK Is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell* **108**: 195-205.
- Avery, O. T., C. M. Macleod & M. McCarty, (1944) Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from *Pneumococcus* Type Iii. *J Exp Med* **79**: 137-158.
- Bach, T. & K. Skarstad, (2004) Re-replication from non-sequesterable origins generates three-nucleoid cells which divide asymmetrically. *Mol Microbiol* **51**: 1589-1600.
- Bacolla, A. & R. D. Wells, (2009) Non-B DNA conformations as determinants of mutagenesis and human disease. *Mol Carcinog* **48**: 273-285.
- Baker, N. M., R. Rajan & A. Mondragon, (2009) Structural studies of type I topoisomerases. *Nucleic Acids Res* **37**: 693-701.
- Bates, D. & N. Kleckner, (2005) Chromosome and replisome dynamics in *E. coli*: loss of sister cohesion triggers global chromosome movement and mediates chromosome segregation. *Cell* **121**: 899-911.
- Been, M. D. & J. J. Champoux, (1984) Breakage of single-stranded DNA by eukaryotic type I topoisomerase occurs only at regions with the potential for base-pairing. *J Mol Biol* **180**: 515-531.
- Beloin, C., J. Jeusset, B. Revet, G. Mirambeau, F. Le Hegarat & E. Le Cam, (2003) Contribution of DNA conformation and topology in right-handed DNA wrapping by the *Bacillus subtilis* LrpC protein. *J Biol Chem* **278**: 5333-5342.
- Belova, G. I., R. Prasad, S. A. Kozyavkin, J. A. Lake, S. H. Wilson & A. I. Slesarev, (2001) A type IB topoisomerase with DNA repair activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6015-6020.
- Beran-Steed, R. K. & Y. C. Tse-Dinh, (1989) The carboxyl terminal domain of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I confers higher affinity to DNA. *Proteins* **6**: 249-258.

- Bergerat, A., B. de Massy, D. Gadelle, P. C. Varoutas, A. Nicolas & P. Forterre, (1997) An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* **386**: 414-417.
- Bernhardt, T. G. & P. A. de Boer, (2005) SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. *Mol Cell* **18**: 555-564.
- Bloom, L. B., (2009) Loading clamps for DNA replication and repair. *DNA Repair (Amst)* **8**: 570-578.
- Bramkamp, M. & S. van Baarle, (2009) Division site selection in rod-shaped bacteria. *Curr Opin Microbiol* **12**: 683-688.
- Brendler, T., J. Sawitzke, K. Sergueev & S. Austin, (2000) A case for sliding SeqA tracts at anchored replication forks during *Escherichia coli* chromosome replication and segregation. *EMBO J* **19**: 6249-6258.
- Broccoli, S., P. Phoenix & M. Drolet, (2000) Isolation of the *topB* gene encoding DNA topoisomerase III as a multicopy suppressor of *topA* null mutations in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **35**: 58-68.
- Buck, G. R. & E. L. Zechiedrich, (2004) DNA disentangling by type-2 topoisomerases. *J Mol Biol* **340**: 933-939.
- Cairns, J., (1963) The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography. *J Mol Biol* **6**: 208-213.
- Capaldo, F. N., G. Ramsey & S. D. Barbour, (1974) Analysis of the growth of recombination-deficient strains of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **118**: 242-249.
- Champoux, J. J., (1977) Strand breakage by the DNA untwisting enzyme results in covalent attachment of the enzyme to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 3800-3804.
- Champoux, J. J., (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* **70**: 369-413.
- Champoux, J. J. & R. Dulbecco, (1972) An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA--a possible swivel for DNA replication (polyoma-ethidium bromide-mouse-embryo cells-dye binding assay). *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 143-146.
- Cheng, C., P. Kussie, N. Pavletich & S. Shuman, (1998) Conservation of structure and mechanism between eukaryotic topoisomerase I and site-specific recombinases. *Cell* **92**: 841-850.
- Confalonieri, F., C. Elie, M. Nadal, C. de La Tour, P. Forterre & M. Duguet, (1993) Reverse gyrase: a helicase-like domain and a type I topoisomerase in the same polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 4753-4757.
- Cook, P. R., (1999) The organization of replication and transcription. *Science* **284**: 1790-1795.
- Cooper, S., (2006) Regulation of DNA synthesis in bacteria: Analysis of the Bates/Kleckner licensing/initiation-mass model for cell cycle control. *Mol Microbiol* **62**: 303-307.
- Cooper, S. & C. E. Helmstetter, (1968) Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli* B/r. *J Mol Biol* **31**: 519-540.
- Corbett, K. D., P. Benedetti & J. M. Berger, (2007) Holoenzyme assembly and ATP-mediated conformational dynamics of topoisomerase VI. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 611-619.
- Corcoran, C. P. & C. J. Dorman, (2009) DNA relaxation-dependent phase biasing of the fim genetic switch in *Escherichia coli* depends on the interplay of H-NS, IHF and LRP. *Mol Microbiol*.
- Dahm, R., (2008) Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Hum Genet* **122**: 565-581.

- Dame, R. T., (2005) The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin. *Mol Microbiol* **56**: 858-870.
- Dame, R. T., C. Wyman & N. Goosen, (2000) H-NS mediated compaction of DNA visualised by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res* **28**: 3504-3510.
- Danilova, O., R. Reyes-Lamothe, M. Pinskaya, D. Sherratt & C. Possoz, (2007) MukB colocalizes with the *oriC* region and is required for organization of the two *Escherichia coli* chromosome arms into separate cell halves. *Mol Microbiol* **65**: 1485-1492.
- Dean, F., M. A. Krasnow, R. Otter, M. M. Matzuk, S. J. Spengler & N. R. Cozzarelli, (1983) *Escherichia coli* type-1 topoisomerases: identification, mechanism, and role in recombination. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **47 Pt 2**: 769-777.
- Delbruck, M., (1954) On the Replication of Desoxyribonucleic Acid (DNA). *Proc Natl Acad Sci U S A* **40**: 783-788.
- Deweese, J. E., M. A. Osheroff & N. Osheroff, (2008) DNA Topology and Topoisomerases: Teaching a "Knotty" Subject. *Biochem Mol Biol Educ* **37**: 2-10.
- DiGate, R. J. & K. J. Marians, (1988) Identification of a potent decatenating enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **263**: 13366-13373.
- DiNardo, S., K. A. Voelkel, R. Sternglanz, A. E. Reynolds & A. Wright, (1983) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations at or near DNA gyrase genes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **47 Pt 2**: 779-784.
- Donachie, W. D., (1968) Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication. *Nature* **219**: 1077-1079.
- Drlica, K., (1984) Biology of bacterial deoxyribonucleic acid topoisomerases. *Microbiol Rev* **48**: 273-289.
- Drlica, K., M. Malik, R. J. Kerns & X. Zhao, (2008) Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 385-392.
- Drolet, M., (2006) Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. *Mol Microbiol* **59**: 723-730.
- Drolet, M., P. Phoenix, R. Menzel, E. Masse, L. F. Liu & R. J. Crouch, (1995) Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* delta *topA* mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3526-3530.
- Duggin, I. G., R. G. Wake, S. D. Bell & T. M. Hill, (2008) The replication fork trap and termination of chromosome replication. *Mol Microbiol* **70**: 1323-1333.
- Dworkin, J. & R. Losick, (2002) Does RNA polymerase help drive chromosome segregation in bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14089-14094.
- Espeli, O. & F. Boccard, (2006) Organization of the *Escherichia coli* chromosome into macrodomains and its possible functional implications. *J Struct Biol* **156**: 304-310.
- Espeli, O., C. Lee & K. J. Marians, (2003a) A physical and functional interaction between *Escherichia coli* FtsK and topoisomerase IV. *J Biol Chem* **278**: 44639-44644.
- Espeli, O., C. Levine, H. Hassing & K. J. Marians, (2003b) Temporal regulation of topoisomerase IV activity in *E. coli*. *Mol Cell* **11**: 189-201.
- Espeli, O. & K. J. Marians, (2004) Untangling intracellular DNA topology. *Mol Microbiol* **52**: 925-931.
- Espeli, O., P. Nurse, C. Levine, C. Lee & K. J. Marians, (2003c) SetB: an integral membrane protein that affects chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **50**: 495-509.
- Filutowicz, M., (1980) Requirement of DNA gyrase for the initiation of chromosome replication in *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* **177**: 301-309.

- Filutowicz, M. & P. Jonczyk, (1983) The *gyrB* gene product functions in both initiation and chain polymerization of *Escherichia coli* chromosome replication: suppression of the initiation deficiency in *gyrB*-ts mutants by a class of *rpoB* mutations. *Mol Gen Genet* **191**: 282-287.
- Forterre, P., (2006) DNA topoisomerase V: a new fold of mysterious origin. *Trends Biotechnol* **24**: 245-247.
- Forterre, P., G. Mirambeau, C. Jaxel, M. Nadal & M. Duguet, (1985) High positive supercoiling in vitro catalyzed by an ATP and polyethylene glycol-stimulated topoisomerase from *Sulfolobus acidocaldarius*. *EMBO J* **4**: 2123-2128.
- Foster, P. L., (2007) Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **42**: 373-397.
- Gellert, M., K. Mizuuchi, M. H. O'Dea & H. A. Nash, (1976) DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 3872-3876.
- Giese KC, Michalowski CB & Little JW., (2008) RecA-dependent cleavage of LexA dimers. *J Mol Biol* **14**;377(1):148-61.
- Gon, S., J. E. Camara, H. K. Klungsoyr, E. Crooke, K. Skarstad & J. Beckwith, (2006) A novel regulatory mechanism couples deoxyribonucleotide synthesis and DNA replication in *Escherichia coli*. *EMBO J* **25**: 1137-1147.
- Goosen, N. & P. van de Putte, (1995) The regulation of transcription initiation by integration host factor. *Mol Microbiol* **16**: 1-7.
- Grainge, I., M. Bregu, M. Vazquez, V. Sivanathan, S. C. Ip & D. J. Sherratt, (2007) Unlinking chromosome catenanes in vivo by site-specific recombination. *EMBO J* **26**: 4228-4238.
- Grompone, G., S. D. Ehrlich & B. Michel, (2003) Replication restart in *gyrB* *Escherichia coli* mutants. *Mol Microbiol* **48**: 845-854.
- Hardy, C. D., N. J. Crisona, M. D. Stone & N. R. Cozzarelli, (2004) Disentangling DNA during replication: a tale of two strands. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**: 39-47.
- Harmon, F. G., R. J. DiGate & S. C. Kowalczykowski, (1999) RecQ helicase and topoisomerase III comprise a novel DNA strand passage function: a conserved mechanism for control of DNA recombination. *Mol Cell* **3**: 611-620.
- Harry, E. J., (2001) Bacterial cell division: regulating Z-ring formation. *Mol Microbiol* **40**: 795-803.
- Heller, R. C. & K. J. Marians, (2006) Replisome assembly and the direct restart of stalled replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 932-943.
- Heller, R. C. & K. J. Marians, (2007) Non-replicative helicases at the replication fork. *DNA Repair (Amst)* **6**: 945-952.
- Hendrickson, H. & J. G. Lawrence, (2007) Mutational bias suggests that replication termination occurs near the *dif* site, not at Ter sites. *Mol Microbiol* **64**: 42-56.
- Hiasa, H., R. J. DiGate & K. J. Marians, (1994) Decatenating activity of *Escherichia coli* DNA gyrase and topoisomerases I and III during *oriC* and pBR322 DNA replication in vitro. *J Biol Chem* **269**: 2093-2099.
- Hiasa, H. & K. J. Marians, (1994) Topoisomerase III, but not topoisomerase I, can support nascent chain elongation during theta-type DNA replication. *J Biol Chem* **269**: 32655-32659.
- Hiasa, H. & K. J. Marians, (1996) Two distinct modes of strand unlinking during theta-type DNA replication. *J Biol Chem* **271**: 21529-21535.
- Hishida, T., Y. W. Han, T. Shibata, Y. Kubota, Y. Ishino, H. Iwasaki & H. Shinagawa, (2004) Role of the *Escherichia coli* RecQ DNA helicase in SOS signaling and genome stabilization at stalled replication forks. *Genes Dev* **18**: 1886-1897.

- Holmes, V. F. & N. R. Cozzarelli, (2000) Closing the ring: links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1322-1324.
- Hwang, D. S. & A. Kornberg, (1992) Opening of the replication origin of *Escherichia coli* by DnaA protein with protein HU or IHF. *J Biol Chem* **267**: 23083-23086.
- Jaxel, C., M. Nadal, G. Mirambeau, P. Forterre, M. Takahashi & M. Duguet, (1989) Reverse gyrase binding to DNA alters the double helix structure and produces single-strand cleavage in the absence of ATP. *EMBO J* **8**: 3135-3139.
- Johnson, A. & M. O'Donnell, (2005) Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annu Rev Biochem* **74**: 283-315.
- Jun, S. & B. Mulder, (2006) Entropy-driven spatial organization of highly confined polymers: lessons for the bacterial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12388-12393.
- Kaidow, A., M. Wachi, J. Nakamura, J. Magae & K. Nagai, (1995) Anucleate cell production by *Escherichia coli* delta hns mutant lacking a histone-like protein, H-NS. *J Bacteriol* **177**: 3589-3592.
- Kampranis, S. C., A. D. Bates & A. Maxwell, (1999) A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8414-8419.
- Kampranis, S. C. & A. Maxwell, (1996) Conversion of DNA gyrase into a conventional type II topoisomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14416-14421.
- Kaplan, D. L. & D. Bastia, (2009) Mechanisms of polar arrest of a replication fork. *Mol Microbiol* **72**: 279-285.
- Kato, J. & T. Katayama, (2001) Hda, a novel DnaA-related protein, regulates the replication cycle in *Escherichia coli*. *EMBO J* **20**: 4253-4262.
- Kato, J., Y. Nishimura, R. Imamura, H. Niki, S. Hiraga & H. Suzuki, (1990) New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* **63**: 393-404.
- Kato, J., Y. Nishimura & H. Suzuki, (1989) *Escherichia coli parA* is an allele of the *gyrB* gene. *Mol Gen Genet* **217**: 178-181.
- Kato, J., Y. Nishimura, M. Yamada, H. Suzuki & Y. Hirota, (1988) Gene organization in the region containing a new gene involved in chromosome partition in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**: 3967-3977.
- Kato, J., H. Suzuki & H. Ikeda, (1992) Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**: 25676-25684.
- Khodursky, A. B., B. J. Peter, M. B. Schmid, J. DeRisi, D. Botstein, P. O. Brown & N. R. Cozzarelli, (2000) Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9419-9424.
- Khodursky, A. B., E. L. Zechiedrich & N. R. Cozzarelli, (1995) Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11801-11805.
- Kim, S., H. G. Dallmann, C. S. McHenry & K. J. Mariani, (1996a) Coupling of a replicative polymerase and helicase: a tau-DnaB interaction mediates rapid replication fork movement. *Cell* **84**: 643-650.
- Kim, S., H. G. Dallmann, C. S. McHenry & K. J. Mariani, (1996b) tau couples the leading- and lagging-strand polymerases at the *Escherichia coli* DNA replication fork. *J Biol Chem* **271**: 21406-21412.
- Kirkegaard, K. & J. C. Wang, (1985) Bacterial DNA topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single-stranded loop. *J Mol Biol* **185**: 625-637.
- Kitagawa, R., T. Ozaki, S. Moriya & T. Ogawa, (1998) Negative control of replication initiation by a novel chromosomal locus exhibiting exceptional affinity for *Escherichia coli* DnaA protein. *Genes Dev* **12**: 3032-3043.
- Kogoma, T., (1997) Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 212-238.



- Kogoma, T., K. G. Barnard & X. Hong, (1994) RecA, Tus protein and constitutive stable DNA replication in *Escherichia coli rnhA* mutants. *Mol Gen Genet* **244**: 557-562.
- Kogoma, T., X. Hong, G. W. Cadwell, K. G. Barnard & T. Asai, (1993) Requirement of homologous recombination functions for viability of the *Escherichia coli* cell that lacks RNase HI and exonuclease V activities. *Biochimie* **75**: 89-99.
- Kogoma, T. & R. R. Maldonado, (1997) DNA polymerase I in constitutive stable DNA replication in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 2109-2115.
- Kogoma, T., K. Skarstad, E. Boye, K. von Meyenburg & H. B. Steen, (1985) RecA protein acts at the initiation of stable DNA replication in *rnh* mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **163**: 439-444.
- Kogoma, T. & K. von Meyenburg, (1983) The origin of replication, *oriC*, and the *dnaA* protein are dispensable in stable DNA replication (*sdrA*) mutants of *Escherichia coli* K-12. *EMBO J* **2**: 463-468.
- Kondo, T., S. Mima, N. Fukuma, K. Sekimizu, T. Tsuchiya & T. Mizushima, (2000) Suppression of temperature-sensitivity of a *dnaA46* mutant by excessive DNA supercoiling. *Biochem J* **348 Pt 2**: 375-379.
- Kouzminova, E. A., E. Rotman, L. Macomber, J. Zhang & A. Kuzminov, (2004) RecA-dependent mutants in *Escherichia coli* reveal strategies to avoid chromosomal fragmentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 16262-16267.
- Kruse, T., B. Blagoev, A. Lobner-Olesen, M. Wachi, K. Sasaki, N. Iwai, M. Mann & K. Gerdes, (2006) Actin homolog MreB and RNA polymerase interact and are both required for chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **20**: 113-124.
- Kruse, T., J. Moller-Jensen, A. Lobner-Olesen & K. Gerdes, (2003) Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*. *EMBO J* **22**: 5283-5292.
- Lemon, K. P. & A. D. Grossman, (2001) The extrusion-capture model for chromosome partitioning in bacteria. *Genes Dev* **15**: 2031-2041.
- Leonard, A. C. & J. E. Grimwade, (2005) Building a bacterial orisome: emergence of new regulatory features for replication origin unwinding. *Mol Microbiol* **55**: 978-985.
- Li, G. M., (2008) Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* **18**: 85-98.
- Li, Z., A. Mondragon, H. Hiasa, K. J. Marians & R. J. DiGate, (2000) Identification of a unique domain essential for *Escherichia coli* DNA topoisomerase III-catalysed decatenation of replication intermediates. *Mol Microbiol* **35**: 888-895.
- Lima, C. D., J. C. Wang & A. Mondragon, (1993) Crystallization of a 67 kDa fragment of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J Mol Biol* **232**: 1213-1216.
- Lima, C. D., J. C. Wang & A. Mondragon, (1994) Three-dimensional structure of the 67K N-terminal fragment of *E. coli* DNA topoisomerase I. *Nature* **367**: 138-146.
- Liu, L. F. & J. C. Wang, (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 7024-7027.
- Liu, Z., R. W. Deibler, H. S. Chan & L. Zechiedrich, (2009) The why and how of DNA unlinking. *Nucleic Acids Res* **37**: 661-671.
- Lopez, C. R., S. Yang, R. W. Deibler, S. A. Ray, J. M. Pennington, R. J. Digate, P. J. Hastings, S. M. Rosenberg & E. L. Zechiedrich, (2005) A role for topoisomerase III in a recombination pathway alternative to RuvABC. *Mol Microbiol* **58**: 80-101.
- Lopez, P. & H. Philippe, (2001) Composition strand asymmetries in prokaryotic genomes: mutational bias and biased gene orientation. *C R Acad Sci III* **324**: 201-208.
- Louarn, J., J. P. Bouche, J. Patte & J. M. Louarn, (1984) Genetic inactivation of topoisomerase I suppresses a defect in initiation of chromosome replication in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **195**: 170-174.
- Madabhushi, R. & K. J. Marians, (2009) Actin homolog MreB affects chromosome segregation by regulating topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *Mol Cell* **33**: 171-180.

- Malik, M., A. Bensaïd, J. Rouviere-Yaniv & K. Drlica, (1996) Histone-like protein HU and bacterial DNA topology: suppression of an HU deficiency by gyrase mutations. *J Mol Biol* **256**: 66-76.
- Mankouri, H. W. & I. D. Hickson, (2007) The RecQ helicase-topoisomerase III-Rmi1 complex: a DNA structure-specific 'dissolvasome'? *Trends Biochem Sci* **32**: 538-546.
- Marians, K. J., (2000) PriA-directed replication fork restart in *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci* **25**: 185-189.
- Markovitz, A., (2005) A new in vivo termination function for DNA polymerase I of *Escherichia coli* K12. *Mol Microbiol* **55**: 1867-1882.
- Masse, E. & M. Drolet, (1999) R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *Escherichia coli topA* mutants preferentially occurs at low temperatures and correlates with growth inhibition. *J Mol Biol* **294**: 321-332.
- Meselson, M. & F. W. Stahl, (1958) The Replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **44**: 671-682.
- Michel, B., H. Boubakri, Z. Baharoglu, M. LeMasson & R. Lestini, (2007) Recombination proteins and rescue of arrested replication forks. *DNA Repair (Amst)* **6**: 967-980.
- Michelsen, O., M. J. Teixeira de Mattos, P. R. Jensen & F. G. Hansen, (2003) Precise determinations of C and D periods by flow cytometry in *Escherichia coli* K-12 and B/r. *Microbiology* **149**: 1001-1010.
- Minden, J. S. & K. J. Mariani, (1986) *Escherichia coli* topoisomerase I can segregate replicating pBR322 daughter DNA molecules in vitro. *J Biol Chem* **261**: 11906-11917.
- Mirkin, S. M. & G. Shmerling Zh, (1982) DNA replication and transcription in a temperature-sensitive mutant of *E. coli* with a defective DNA gyrase B subunit. *Mol Gen Genet* **188**: 91-95.
- Mondragon, A. & R. DiGate, (1999) The structure of *Escherichia coli* DNA topoisomerase III. *Structure* **7**: 1373-1383.
- Morigen, A. Lobner-Olesen & K. Skarstad, (2003) Titration of the *Escherichia coli* DnaA protein to excess *datA* sites causes destabilization of replication forks, delayed replication initiation and delayed cell division. *Mol Microbiol* **50**: 349-362.
- Mott, M. L. & J. M. Berger, (2007) DNA replication initiation: mechanisms and regulation in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **5**: 343-354.
- Naktinis, V., R. Onrust, L. Fang & M. O'Donnell, (1995) Assembly of a chromosomal replication machine: two DNA polymerases, a clamp loader, and sliding clamps in one holoenzyme particle. II. Intermediate complex between the clamp loader and its clamp. *J Biol Chem* **270**: 13358-13365.
- Newman, E. B. & R. Lin, (1995) Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*. *Annu Rev Microbiol* **49**: 747-775.
- Nichols, M. D., K. DeAngelis, J. L. Keck & J. M. Berger, (1999) Structure and function of an archaeal topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination factor Spo11. *EMBO J* **18**: 6177-6188.
- Nievera, C., J. J. Torgue, J. E. Grimwade & A. C. Leonard, (2006) SeqA blocking of DnaA-oriC interactions ensures staged assembly of the *E. coli* pre-RC. *Mol Cell* **24**: 581-592.
- Niki, H., A. Jaffe, R. Imamura, T. Ogura & S. Hiraga, (1991) The new gene *mukB* codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. *EMBO J* **10**: 183-193.
- Nollmann, M., M. D. Stone, Z. Bryant, J. Gore, N. J. Crisona, S. C. Hong, S. Mittelheiser, A. Maxwell, C. Bustamante & N. R. Cozzarelli, (2007) Multiple modes of *Escherichia coli* DNA gyrase activity revealed by force and torque. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 264-271.

- Nozaki, S., Y. Yamada & T. Ogawa, (2009) Initiator titration complex formed at *datA* with the aid of IHF regulates replication timing in *Escherichia coli*. *Genes Cells* **14**: 329-341.
- Nurse, P., C. Levine, H. Hassing & K. J. Mariani, (2003) Topoisomerase III can serve as the cellular decatenase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**: 8653-8660.
- O'Reilly, E. K. & K. N. Kreuzer, (2004) Isolation of SOS constitutive mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**: 7149-7160.
- Ogawa, T. & T. Okazaki, (1984) Function of RNase H in DNA replication revealed by RNase H defective mutants of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **193**: 231-237.
- Olsson, J. A., K. Nordstrom, K. Hjort & S. Dasgupta, (2003) Eclipse-synchrony relationship in *Escherichia coli* strains with mutations affecting sequestration, initiation of replication and superhelicity of the bacterial chromosome. *J Mol Biol* **334**: 919-931.
- Pardo, B., B. Gomez-Gonzalez & A. Aguilera, (2009) DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci* **66**: 1039-1056.
- Peng, H. & K. J. Mariani, (1993a) Decatenation activity of topoisomerase IV during *oriC* and pBR322 DNA replication in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 8571-8575.
- Peng, H. & K. J. Mariani, (1993b) *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *J Biol Chem* **268**: 24481-24490.
- Peter, B. J., J. Arsuaga, A. M. Breier, A. B. Khodursky, P. O. Brown & N. R. Cozzarelli, (2004) Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. *Genome Biol* **5**: R87.
- Peter, B. J., C. Ullsperger, H. Hiasa, K. J. Mariani & N. R. Cozzarelli, (1998) The structure of supercoiled intermediates in DNA replication. *Cell* **94**: 819-827.
- Plank, J. & T. S. Hsieh, (2009) Helicase-appended topoisomerases: new insight into the mechanism of directional strand transfer. *J Biol Chem* **284**: 30737-30741.
- Pommier, Y., (2009) DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chem Rev* **109**: 2894-2902.
- Postow, L., C. D. Hardy, J. Arsuaga & N. R. Cozzarelli, (2004) Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev* **18**: 1766-1779.
- Rattray, A. J. & J. N. Strathern, (2003) Error-prone DNA polymerases: when making a mistake is the only way to get ahead. *Annu Rev Genet* **37**: 31-66.
- Reece, R. J. & A. Maxwell, (1991) The C-terminal domain of the *Escherichia coli* DNA gyrase A subunit is a DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res* **19**: 1399-1405.
- Reyes-Lamothe, R., X. Wang & D. Sherratt, (2008) *Escherichia coli* and its chromosome. *Trends Microbiol* **16**: 238-245.
- Roca, J. & J. C. Wang, (1992) The capture of a DNA double helix by an ATP-dependent protein clamp: a key step in DNA transport by type II DNA topoisomerases. *Cell* **71**: 833-840.
- Roca, J. & J. C. Wang, (1994) DNA transport by a type II DNA topoisomerase: evidence in favor of a two-gate mechanism. *Cell* **77**: 609-616.
- Rohs, R., S. M. West, P. Liu & B. Honig, (2009) Nuance in the double-helix and its role in protein-DNA recognition. *Curr Opin Struct Biol* **19**: 171-177.
- Rudolph, C. J., P. Dhillon, T. Moore & R. G. Lloyd, (2007) Avoiding and resolving conflicts between DNA replication and transcription. *DNA Repair (Amst)* **6**: 981-993.
- Sawitzke, J. A. & S. Austin, (2000) Suppression of chromosome segregation defects of *Escherichia coli muk* mutants by mutations in topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1671-1676.

- Schofield, M. A., R. Agbunag, M. L. Michaels & J. H. Miller, (1992) Cloning and sequencing of *Escherichia coli mutR* shows its identity to *topB*, encoding topoisomerase III. *J Bacteriol* **174**: 5168-5170.
- Scocca, J. R. & T. A. Shapiro, (2008) A mitochondrial topoisomerase IA essential for late theta structure resolution in African trypanosomes. *Mol Microbiol* **67**: 820-829.
- Sherratt, D. J., B. Soballe, F. X. Barre, S. Filipe, I. Lau, T. Massey & J. Yates, (2004) Recombination and chromosome segregation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**: 61-69.
- Shindo, H., A. Furubayashi, M. Shimizu, M. Miyake & F. Imamoto, (1992) Preferential binding of *E. coli* histone-like protein HU alpha to negatively supercoiled DNA. *Nucleic Acids Res* **20**: 1553-1558.
- Simmons, L. A., A. M. Breier, N. R. Cozzarelli & J. M. Kaguni, (2004) Hyperinitiation of DNA replication in *Escherichia coli* leads to replication fork collapse and inviability. *Mol Microbiol* **51**: 349-358.
- Skarstad, K. & E. Boye, (1993) Degradation of individual chromosomes in *recA* mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**: 5505-5509.
- Skarstad, K., E. Boye & H. B. Steen, (1986) Timing of initiation of chromosome replication in individual *Escherichia coli* cells. *EMBO J* **5**: 1711-1717.
- Slesarev, A. I., K. O. Stetter, J. A. Lake, M. Gellert, R. Krah & S. A. Kozyavkin, (1993) DNA topoisomerase V is a relative of eukaryotic topoisomerase I from a hyperthermophilic prokaryote. *Nature* **364**: 735-737.
- Speck, C., C. Weigel & W. Messer, (1999) ATP- and ADP-dnaA protein, a molecular switch in gene regulation. *EMBO J* **18**: 6169-6176.
- Spurio, R., M. Durrenberger, M. Falconi, A. La Teana, C. L. Pon & C. O. Gualerzi, (1992) Lethal overproduction of the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS: ultramicroscopic and molecular autopsy. *Mol Gen Genet* **231**: 201-211.
- Srivenugopal, K. S., D. Lockshon & D. R. Morris, (1984) *Escherichia coli* DNA topoisomerase III: purification and characterization of a new type I enzyme. *Biochemistry* **23**: 1899-1906.
- Steck, T. R. & K. Drlica, (1984) Bacterial chromosome segregation: evidence for DNA gyrase involvement in decatenation. *Cell* **36**: 1081-1088.
- Stewart, L., M. R. Redinbo, X. Qiu, W. G. Hol & J. J. Champoux, (1998) A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science* **279**: 1534-1541.
- Suski, C. & K. J. Mariani, (2008) Resolution of converging replication forks by RecQ and topoisomerase III. *Mol Cell* **30**: 779-789.
- Taneja, B., B. Schnurr, A. Slesarev, J. F. Marko & A. Mondragon, (2007) Topoisomerase V relaxes supercoiled DNA by a constrained swiveling mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 14670-14675.
- Tougu, K. & K. J. Mariani, (1996) The interaction between helicase and primase sets the replication fork clock. *J Biol Chem* **271**: 21398-21405.
- Trucksis, M. & R. E. Depew, (1981) Identification and localization of a gene that specifies production of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 2164-2168.
- Tse-Dinh, Y. C., (1991) Zinc (II) coordination in *Escherichia coli* DNA topoisomerase I is required for cleavable complex formation with DNA. *J Biol Chem* **266**: 14317-14320.
- Uematsu, N., S. Eda & K. Yamamoto, (1997) An *Escherichia coli topB* mutant increases deletion and frameshift mutations in the *supF* target gene. *Mutat Res* **383**: 223-230.
- Usongo, V., F. Nolent, P. Sanscartier, C. Tanguay, S. Broccoli, I. Baaklini, K. Drlica & M. Drolet, (2008) Depletion of RNase HI activity in *Escherichia coli* lacking DNA

- topoisomerase I leads to defects in DNA supercoiling and segregation. *Mol Microbiol* **69**: 968-981.
- Vicente, M., A. I. Rico, R. Martinez-Arteaga & J. Mingorance, (2006) Septum enlightenment: assembly of bacterial division proteins. *J Bacteriol* **188**: 19-27.
- Vologodskii, A. V., W. Zhang, V. V. Rybenkov, A. A. Podtelezhnikov, D. Subramanian, J. D. Griffith & N. R. Cozzarelli, (2001) Mechanism of topology simplification by type II DNA topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 3045-3049.
- von Freiesleben, U. & K. V. Rasmussen, (1992) The level of supercoiling affects the regulation of DNA replication in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **143**: 655-663.
- von Meyenburg, K., E. Boye, K. Skarstad, L. Koppes & T. Kogoma, (1987) Mode of initiation of constitutive stable DNA replication in RNase H-defective mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **169**: 2650-2658.
- Wang, J. C., (1971) Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega. *J Mol Biol* **55**: 523-533.
- Wang, J. C., (1991) DNA topoisomerases: why so many? *J Biol Chem* **266**: 6659-6662.
- Wang, J. C., (1996) DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* **65**: 635-692.
- Wang, J. C., (1998) Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Q Rev Biophys* **31**: 107-144.
- Wang, J. C., (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 430-440.
- Wang, J. D. & P. A. Levin, (2009) Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle. *Nat Rev Microbiol* **7**: 822-827.
- Wang, J. D., G. M. Sanders & A. D. Grossman, (2007) Nutritional control of elongation of DNA replication by (p)ppGpp. *Cell* **128**: 865-875.
- Wang, X., R. Reyes-Lamothe & D. J. Sherratt, (2008) Modulation of *Escherichia coli* sister chromosome cohesion by topoisomerase IV. *Genes Dev* **22**: 2426-2433.
- Watson, J. D. & F. H. Crick, (1953a) Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* **171**: 964-967.
- Watson, J. D. & F. H. Crick, (1953b) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**: 737-738.
- Weigel, C., W. Messer, S. Preiss, M. Welzeck, Morigen & E. Boye, (2001) The sequence requirements for a functional *Escherichia coli* replication origin are different for the chromosome and a minichromosome. *Mol Microbiol* **40**: 498-507.
- Wold, S., K. Skarstad, H. B. Steen, T. Stokke & E. Boye, (1994) The initiation mass for DNA replication in *Escherichia coli* K-12 is dependent on growth rate. *EMBO J* **13**: 2097-2102.
- Wu, L., (2007) Role of the BLM helicase in replication fork management. *DNA Repair (Amst)* **6**: 936-944.
- Wu, L. & I. D. Hickson, (2006) DNA helicases required for homologous recombination and repair of damaged replication forks. *Annu Rev Genet* **40**: 279-306.
- Zaritsky, A., N. Vischer & A. Rabinovitch, (2007) Changes of initiation mass and cell dimensions by the 'eclipse'. *Mol Microbiol* **63**: 15-21.
- Zechiedrich, E. L. & N. R. Cozzarelli, (1995) Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **9**: 2859-2869.
- Zechiedrich, E. L., A. B. Khodursky, S. Bachellier, R. Schneider, D. Chen, D. M. Lilley & N. R. Cozzarelli, (2000) Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**: 8103-8113.
- Zechiedrich, E. L., A. B. Khodursky & N. R. Cozzarelli, (1997) Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **11**: 2580-2592.

- Zechiedrich, E. L. & N. Osheroff, (1990) Eukaryotic topoisomerases recognize nucleic acid topology by preferentially interacting with DNA crossovers. *EMBO J* **9**: 4555-4562.
- Zhang, H. L., S. Malpure, Z. Li, H. Hiasa & R. J. DiGate, (1996) The role of the carboxyl-terminal amino acid residues in *Escherichia coli* DNA topoisomerase III-mediated catalysis. *J Biol Chem* **271**: 9039-9045.
- Zhu, Q., P. Pongpech & R. J. DiGate, (2001) Type I topoisomerase activity is required for proper chromosomal segregation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 9766-9771.
- Zyskind, J. W. & D. W. Smith, (1992) DNA replication, the bacterial cell cycle, and cell growth. *Cell* **69**: 5-8.

## 6. Annexe

### 6.1 Résultats supplémentaires

**Tableau I. Changement d'expression génique (« fold change ») suivant la déplétion de la RNase HI.**

Gène	Protéine	« Fold change »		
		WT à <i>rnhA</i>	PS152 à PS151 -	PS151 + à PS151 -
<b>Topoisomérase</b>				
<i>topA</i>	Topoisomérase I	1,081 (-)	1,277 (+)	1,342 (-)
<i>gyrA</i>	Gyrase (sous-unité A)	1,454 (-)	1,303 (-)	1,606 (-)
<i>gyrB</i>	Gyrase (sous-unité B)	1,636 (-)	1,157 (-)	1,017 (+)
<i>topB</i>	Topoisomérase III	1,045 (-)	1,119 (-)	1,090 (-)
<i>parC</i>	Topoisomérase IV (sous-unité C)	1,072 (-)	1,096 (+)	1,253 (-)
<i>parE</i>	Topoisomérase IV (sous-unité E)	1,164 (-)	1,426 (-)	2,593 (-)
<b>Protéines de liaison à l'ADN</b>				
<i>hupA</i>	HU- $\alpha$	1,564 (-)	1,229 (+)	1,193 (-)
<i>hupB</i>	HU- $\beta$	2,032 (-)	1,537 (+)	1,458 (+)
<i>ihfA</i>	IHF- $\alpha$	1,481 (+)	1,399 (+)	1,747 (+)
<i>ihfB</i>	IHF- $\beta$	1,061 (+)	1,598 (+)	1,669 (+)
<i>hns</i>	H-NS	1,327 (-)	1,372 (+)	1,467 (+)
<i>fis</i>	Fis	1,075 (+)	1,109 (-)	1,754 (-)
<i>mukB</i>	MukB	1,225 (-)	2,497 (-)	2,889 (-)
<i>mukE</i>	MukE	1,857 (-)	1,708 (-)	2,720 (-)
<i>mukF</i>	MukF	1,440 (-)	2,164 (-)	2,711 (-)
<i>mreB</i>	MreB	1,236 (-)	1,029 (-)	1,465 (-)
<i>seqA</i>	SeqA	1,932 (-)	1,525 (-)	1,533 (-)
<i>setB</i>	SetB	1,091 (+)	2,198 (-)	2,880 (-)

**Division cellulaire**

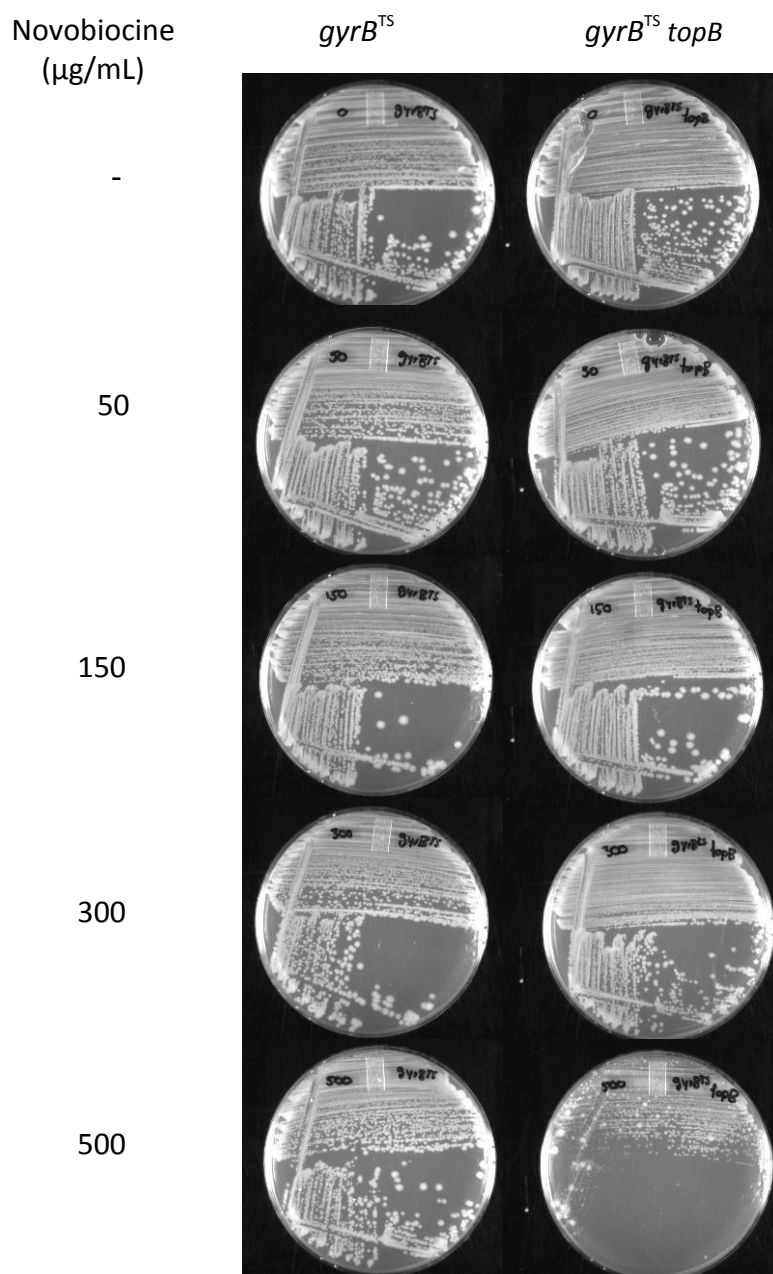
<i>ftsZ</i>	FtsZ	1,068 (+)	1,037 (+)	1,107 (-)
-------------	------	-----------	-----------	-----------

**Réponse aux dommages à l'ADN**

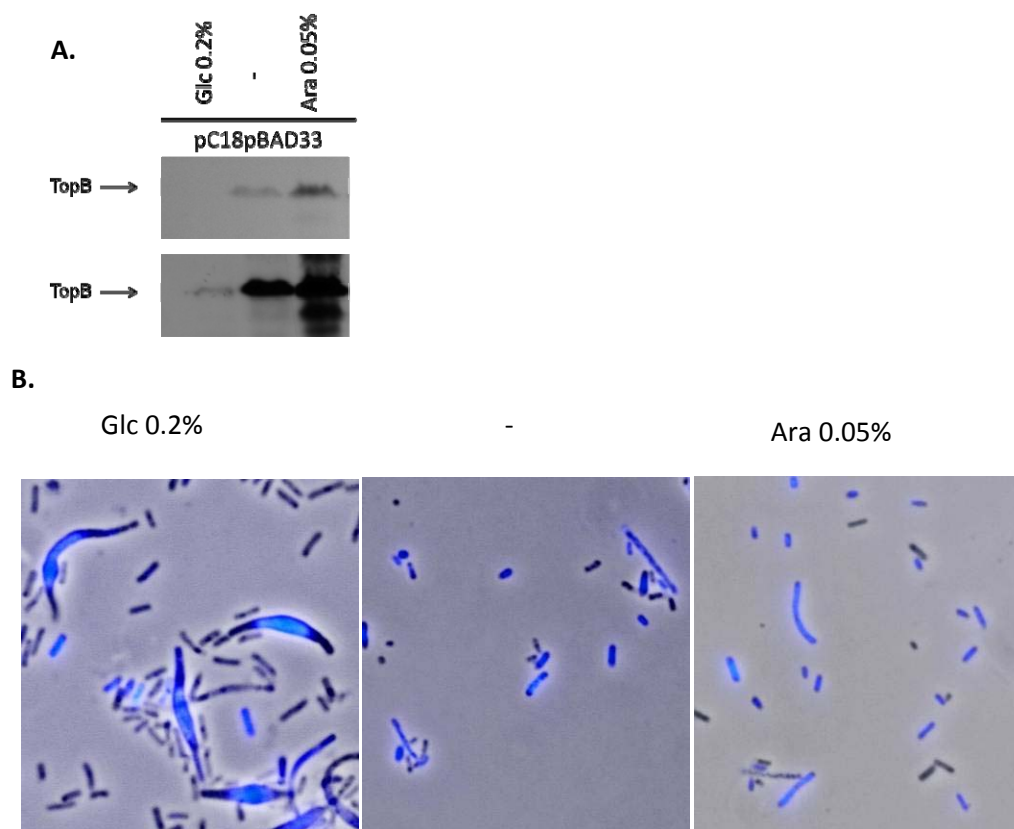
<i>dinB</i>	Polymérase IV	4,675 (+)	3,466 (+)	2,427 (+)
<i>lexA</i>	LexA (répresseur de la réponse SOS)	2,608 (+)	3,236 (+)	2,123 (+)
<i>recA</i>	RecA (recombinase)	2,814 (+)	2,512 (+)	1,518 (+)
<i>ruvA</i>	RuvA (hélicase)	3,098 (+)	4,036 (+)	2,972 (+)
<i>ruvB</i>	RuvB (hélicase)	2,721 (+)	2,701 (+)	1,907 (+)
<i>sbmC</i>	GyrI (inhibiteur de gyrase)	7,964 (+)	2,660 (+)	8,132 (+)
<i>sfiA</i>	SfiA (inhibiteur de division cellulaire)	8,658 (+)	2,910 (+)	3,737 (+)
<i>ssb</i>	SSB (liaison à l'ADNsb)	1,030 (-)	1,371 (-)	1,412 (-)
<i>umuC</i>	Polymérase V	6,077 (+)	1,885 (+)	1,340 (+)
<i>umuD</i>	Polymérase V	3,906 (+)	2,117 (+)	1,500 (+)
<i>uvrA</i>	UvrA (exonucléase)	3,279 (+)	2,911 (+)	2,077 (+)
<i>uvrB</i>	UvrB (exonucléase)	2,837 (+)	1,535 (+)	1,452 (+)

Où (+) signifie que le niveau d'expression du gène augmente d'une souche à l'autre et (-) signifie que l'expression diminue. Les souches utilisées sont RFM430 de type sauvage, RFM430 *rnhA::cam*, PS152 (*gyrB221 gyrB<sup>TS</sup> topA20::Tn10*) et PS151 (*gyrB221 gyrB<sup>TS</sup> topA20::Tn10 rnhA::cam* + pBAD18*rnhA* (« + » avec arabinose, donc RNase HI surproduite et « - » sans arabinose, donc sans RNase HI). Trois conditions différentes de déplétion de la RNase HI sont représentées. Les échantillons d'ARN ont été envoyés à NimbleGen© pour l'analyse d'expression génique. Les données ont été analysées avec le logiciel ArrayStar® v2.1. Aucun changement d'expression significatif n'est observé pour une topoisomérase ou une protéine de liaison à l'ADN. Plusieurs mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN sont induits.

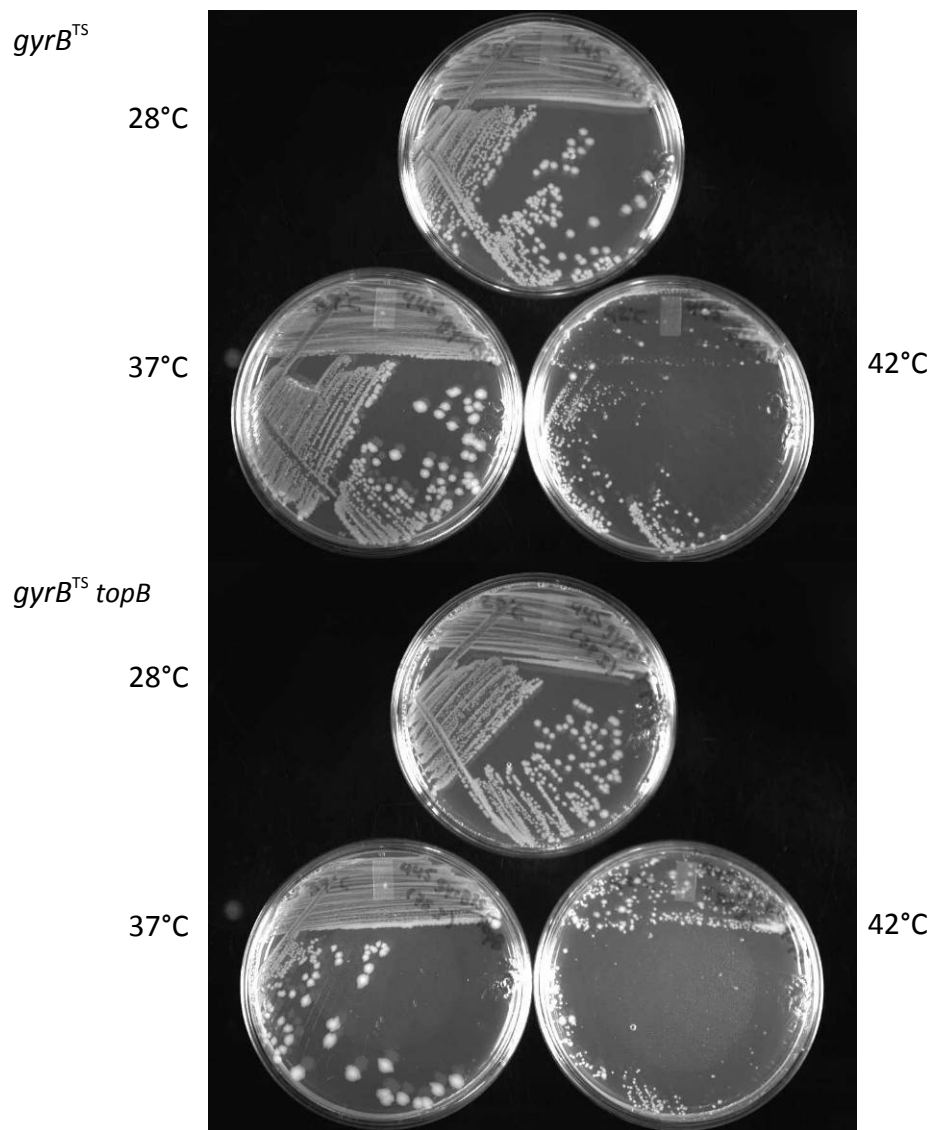




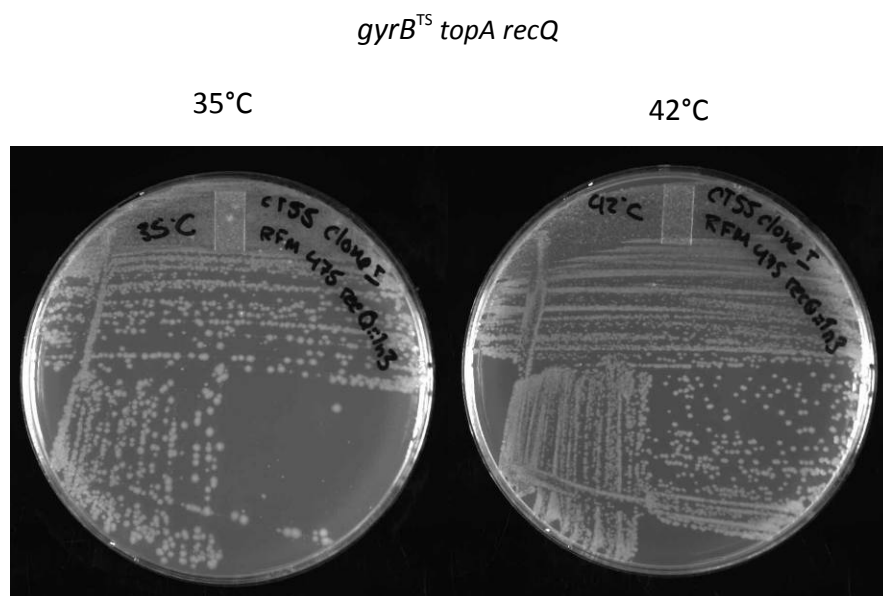
**Figure 1. Cibles de la novobiocine selon les concentrations utilisées.** L'allèle *gyrB* est résistant à la novobiocine. Les pétris contiennent, respectivement 0, 50, 150, 300 et 500  $\mu\text{g/mL}$  de novobiocine. L'incubation a duré 48 heures à 28 °C. Les souches utilisées sont CT21 (RFM445 *gyrB221 gyrB*<sup>TS</sup>) et CT78 clone I (RFM445 *gyrB221 gyrB*<sup>TS</sup> *topB*::*Km*). Une concentration de 150  $\mu\text{g/mL}$  n'est pas suffisante pour inhiber la topoisomérase IV.



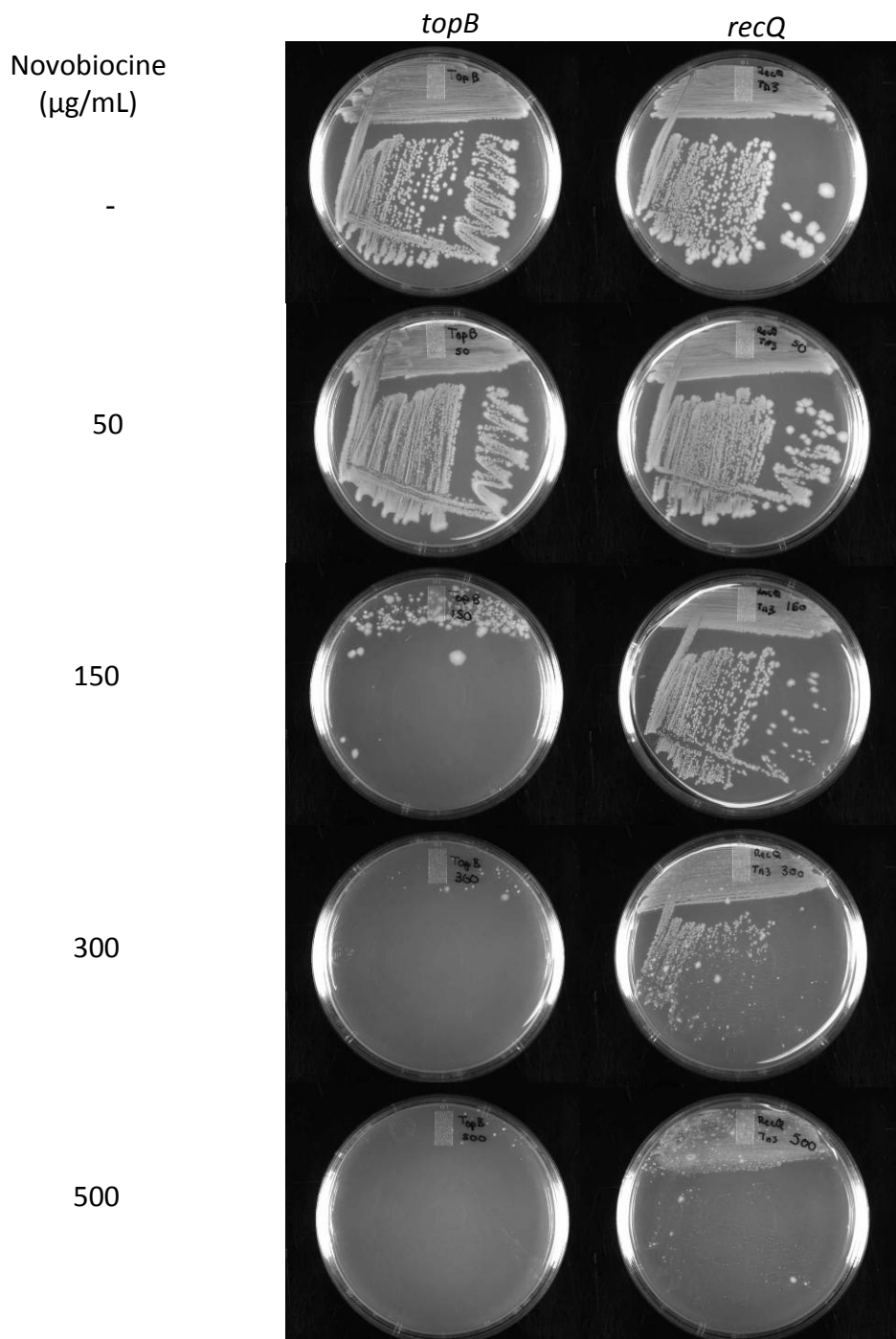
**Figure 2. Correction des défauts de ségrégation par l'expression de la topoisomérase III à de très hauts niveaux.** A. Les niveaux de TopB ont été vérifiés par Western blot. B. Les défauts de ségrégation extrêmes d'une souche *gyrB<sup>TS</sup>* après 3 jours d'incubation à température non-permissible (42 °C) sont visibles sur un milieu contenant du glucose 0,2% (pour l'inhibition du plasmide pc18pBAD33) et partiellement corrigés par l'expression de topoisomérase III à de très forts niveaux (milieu contenant 0,05% arabinose).



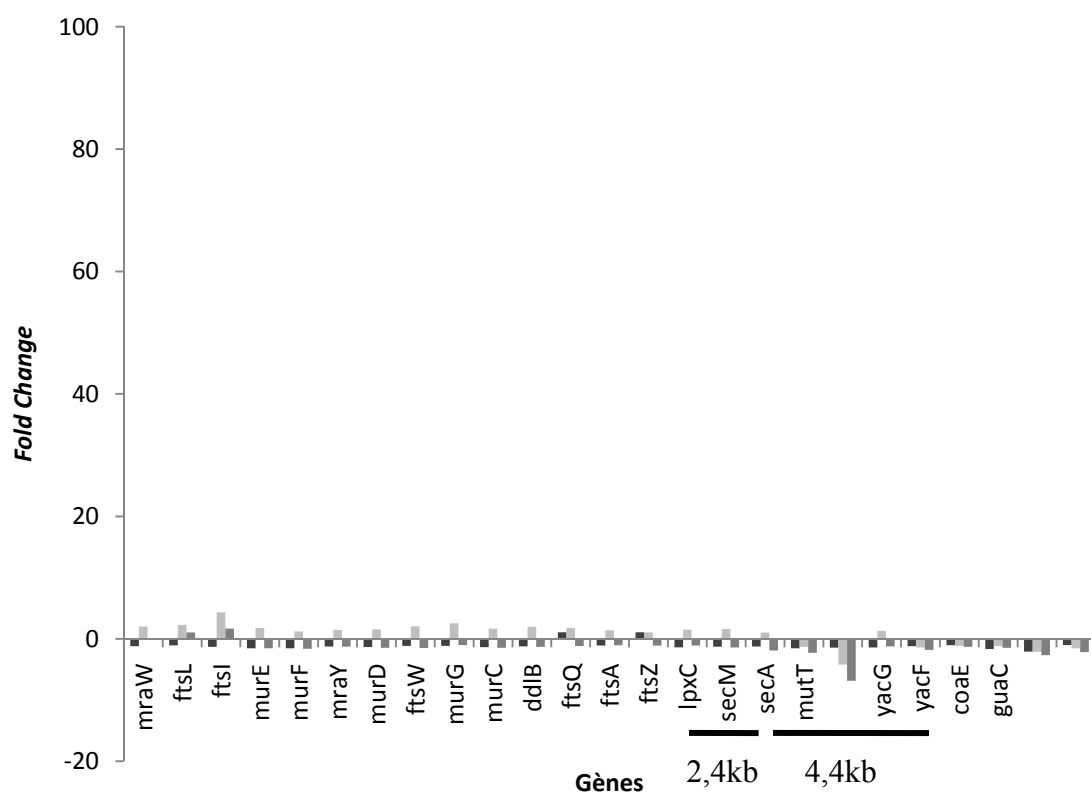
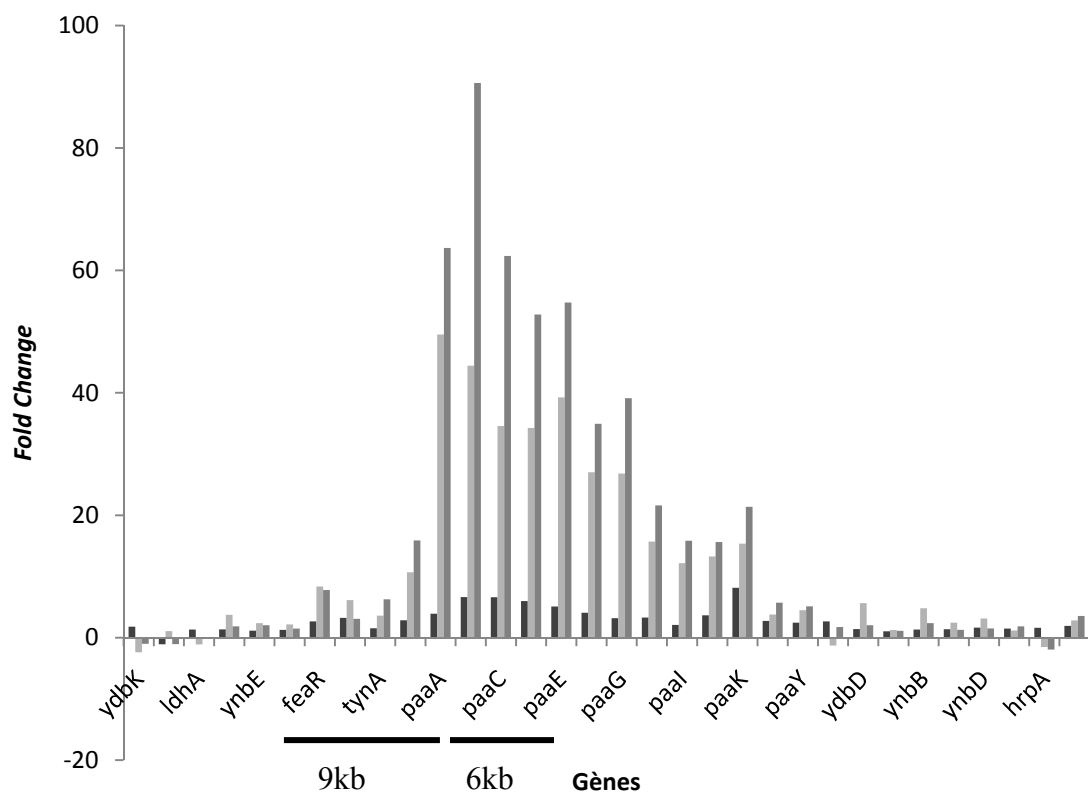
**Figure 3. Thermo sensibilité d'une souche *gyrB<sup>TS</sup> topB*.** Incubation de 48 heures aux températures indiquées. Les souches utilisées sont CT21 (RFM445 *gyrB221 gyrB<sup>TS</sup>*) et CT78 clone I (RFM445 *gyrB221 gyrB<sup>TS</sup> topB::Km*). La délétion de *topB* ne rend pas la souche *gyrB<sup>TS</sup>* plus sensible aux hautes températures (42 °C).



**Figure 4. Viabilité d'un triple mutant *gyrB<sup>TS</sup> topA recQ*.** Incubation de 18 heures aux températures indiquées. La souche utilisée est CT55 clone I (*gyrB221 gyrB<sup>TS</sup> ΔtopA recQ1803::Tn3*). Ce triple mutant a une excellente croissance.



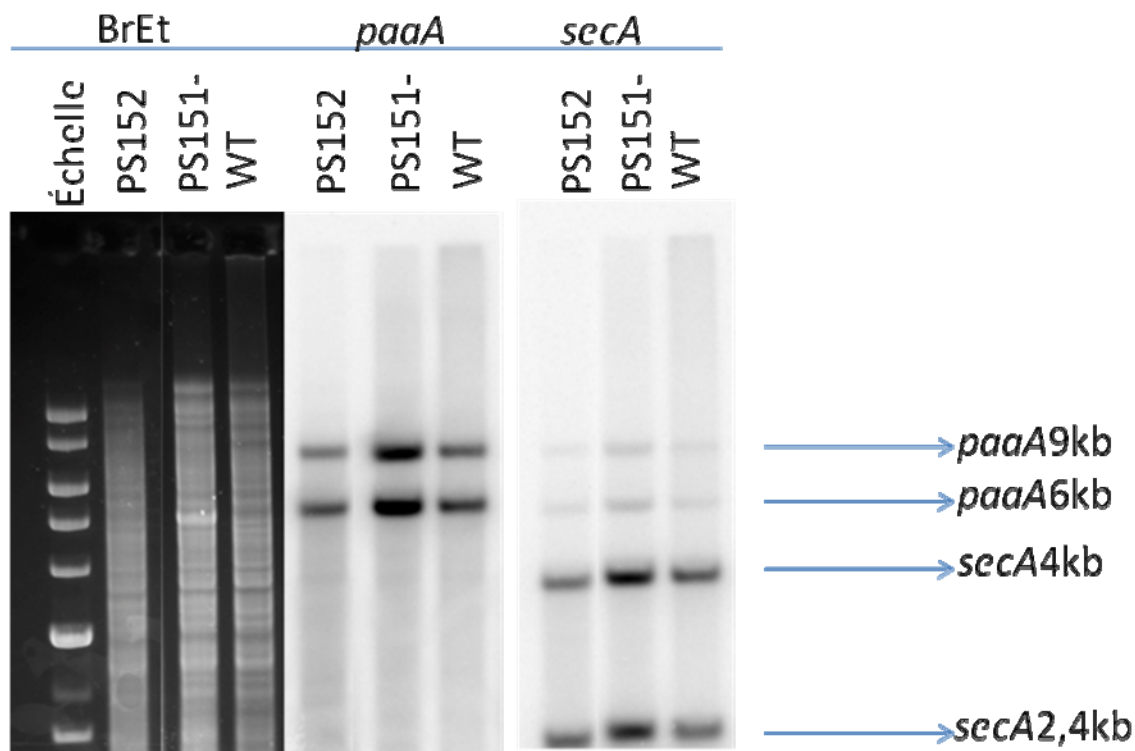
**Figure 5. Sensibilité de d'une souche *recQ* à la novobiocine.** Incubation de 48 heures à 37 °C. les souches utilisées sont CT77 clone I (RFM 443 *topB::Km*) et CT119 (RFM443 *recQ1803::Tn3*). Ces résultats ont été réalisés en collaboration avec le stagiaire Pascal Pong. Alors que la délétion de *topB* rend la novobiocine inhibitrice à 150  $\mu\text{g/mL}$ , une souche *recQ* tolère l'antibiotique.



Légende :

■ WT à *rnhA*    □ PS152 à PS151 -    ■ PS151 + à PS151 -

**Figure 6A. Amplification génique.** Le « *fold change* » représente l'augmentation de l'expression génique retrouvée lorsque deux conditions sont comparées. Les souches utilisées sont RFM430 de type sauvage, RFM430 *rnhA::cam*, PS152 (*gyrB221 gyrB<sup>TS</sup> topA20::Tn10*) et PS151 (*gyrB221 gyrB<sup>TS</sup> topA20::Tn10 rnhA::cam* + pBAD18*rnhA* (« + » avec arabinose, donc RNase HI surproduite et « - » sans arabinose, donc sans RNase HI surproduite). La région *paaA* est représentée avec les gènes selon l'ordre retrouvé sur le chromosome. Cette région est amplifiée selon le niveau de RNase HI retrouvé. La sonde utilisée repère la région entre *feaR* et *paaA* (9kb) et la région entre *paaA* et *paaF*. La région *secA* est une région contrôle où aucune amplification n'est retrouvée. La sonde utilisée repère la région entre *lpxC* et *secA* (2,4kb) et la région entre *secA* et *coaE* (4,4 kb). Le même axe des ordonnées est utilisé pour les deux graphiques afin d'illustrer l'amplification génique de la région *paaA*.



**Figure 6B. Quantification de l'ADN.** L'ADN a été extrait des souches indiquées, puis digéré avec *EcoRV* avant la migration et le transfert sur membrane (« *Southern* »). L'ADN a été coloré au bromure d'éthidium (BrEt) et les sondes utilisées ont été marquées au  $^{32}\text{P}$ . Le signal obtenu est détecté à l'aide d'un *Typhoon*<sup>TM</sup>. Suite à la quantification des signaux obtenus pour les régions amplifiées (*paaA*) et non-amplifiées (*secA*), il s'avère qu'aucune amplification n'est retrouvée au niveau de l'ADN, contrairement aux résultats obtenus au niveau de l'expression génique (figure 6A).



## 6.2 Article

### **Depletion of RNase HI activity in *Escherichia coli* lacking DNA topoisomérase I leads to defects in DNA supercoiling and segregation**

Valentine Usongo<sup>1</sup>, Flora Nolent<sup>1</sup>, Patrick Sanscartier<sup>1</sup>, Cynthia Tanguay<sup>1</sup>, Sonia Broccoli<sup>1</sup>, Imad Baaklini<sup>1</sup>, Karl Drlica<sup>2</sup> and Marc Drolet<sup>1,3</sup>

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

<sup>2</sup>Public Health Research Institute, Newark, NJ

<sup>3</sup>Corresponding author

Phone: [REDACTED]

Fax: [REDACTED]

Email: [REDACTED]

**Abstract**

Gyrase-mediated hypernegative supercoiling is one manifestation of R-loop formation, a phenomenon that is normally suppressed by topoisomerase I (*topA*) in *Escherichia coli*. Overproduction of RNase HI (*rnhA*), an enzyme that removes the RNA moiety of R-loops, prevents hypernegative supercoiling and allows growth of *topA* null mutants. We previously showed that *topA* and *rnhA* null mutations are incompatible. We now report that such mutants were viable when RNase HI or topoisomerase III was expressed from a plasmid-borne gene. Surprisingly, DNA of *topA* null mutants became relaxed rather than hypernegatively supercoiled following depletion of RNase HI activity. This result failed to correlate with the cellular concentration of gyrase or topoisomerase IV (the other relaxing enzyme in the cell) or with transcription-induced supercoiling. Rather, intracellular DNA relaxation in the absence of RNase HI was related to inhibition of gyrase activity both *in vivo* and in extracts. Cells lacking *topA* and *rnhA* also exhibited properties consistent with segregation defects. Overproduction of topoisomerase III, an enzyme that can carry out DNA decatenation, corrected the segregation defects without restoring supercoiling activity. Collectively these data reveal 1) the existence of a cellular response to loss of RNase HI that counters the supercoiling activity of gyrase and 2) supercoiling-independent segregation defects due to loss of RNase HI from *topA* null mutants. Thus RNase HI plays a more central role in DNA topology than previously thought.

**Key words:** *topA*, topoisomerase I, gyrase, RNase HI, segregation

## Introduction

Negative DNA supercoiling is a regulated feature of bacterial chromosomes (Menzel and Gellert, 1983; DiNardo *et al.*, 1982; Pruss *et al.*, 1982; Drlica, 1992) that is important for most processes involving DNA strand separation. In *E. coli*, supercoiling regulation is achieved largely by DNA topoisomerases with opposing enzymatic activities. DNA gyrase, encoded by *gyrA* and *gyrB*, introduces negative supercoils, while two other enzymes, DNA topoisomerase I (*topA*) and DNA topoisomerase IV (*parC* and *parE*), remove excess negative supercoils (Pruss *et al.*, 1982; Zechiedrich *et al.*, 2000). Although the ability to create *topA* null mutants is a clear indication that topoisomerase I is not required for survival (Sternglanz *et al.*, 1981; Stupina and Wang, 2005), growth of such mutants often requires compensatory mutations that reduce negative supercoiling (DiNardo *et al.*, 1982; Pruss *et al.*, 1982). Indeed, very high levels of supercoiling (hypernegative supercoiling, detected as plasmid topoisomers that cannot be resolved by electrophoresis in agarose gels (Pruss, 1985) can accumulate in *topA* null mutants (Pruss, 1985) and correlate with growth inhibition (Massé and Drolet, 1999a,b).

One major pathway for generating hypernegative supercoiling in *topA* mutants involves R-loop formation coupled to gyrase activity (Massé and Drolet, 1999c). Hypernegative supercoiling is initiated by the accumulation of negative supercoils behind moving RNA polymerase when topoisomerase I is absent (Massé and Drolet, 1999c). These negative supercoils promote re-hybridization of nascent transcripts to the template DNA strand, which leaves the non-template strand unpaired and the DNA relaxed. Relaxed DNA is a substrate for gyrase, which then introduces more supercoils that lead to increased R-loop formation, more DNA relaxation, and increased gyrase action (Drolet *et al.*, 1994; Phoenix *et al.*, 1997; Drolet, 2006). Removal of RNA-DNA hybrids by overproduction of RNase HI suppresses the accumulation of hypernegative supercoils and the associated growth defect (Drolet *et al.*, 1995; Massé and Drolet, 1999c). Growth inhibition and hypernegative supercoiling also correlate with major gene expression defects, as illustrated by the accumulation of truncated RNAs (Baaklini *et al.*, 2004; Baaklini *et al.*, manuscript

submitted). Within this context, our inability to construct double *topA rnhA* null mutants did not come as a surprise (Massé and Drolet, 1999b; Drolet *et al.*, 1995). Indeed, it was predicted that such double mutants would die from toxic levels of hypernegative supercoiling.

In the present work, we constructed *topA rnhA* double mutants that grew when *rnhA* was expressed from a plasmid-borne gene. Unexpectedly, we found that under non-permissive conditions the DNA of such mutants was relaxed, not hypernegatively supercoiled. Depletion of RNase HI activity in *topA* null mutants triggered a cellular response that inhibited supercoiling by gyrase. Moreover, the growth inhibition of *topA rnhA* null double mutants correlated with phenotypes reminiscent of segregation defects: extensive cell filamentation with abnormal nucleoid structures and accumulation of anucleate cells. Overproduction of topoisomerase III (*topB*), a type IA enzyme like topoisomerase I, corrected the segregation defects and allowed *topA rnhA* double mutants to grow without restoring supercoiling. Such activity was consistent with topoisomerase III being able to decatenate daughter DNA molecules (Hiasa *et al.*, 1994) and use R-loops as a substrate (Broccoli *et al.*, 2000). Thus high-level expression of a plasmid-borne *topB* gene provided a second way to allow conditional growth of *topA rnhA* double mutants. Below we describe measurements of bacterial DNA supercoiling and cell morphology that reveal an important role for RNase HI in preventing transcription from perturbing DNA topology beyond viable bounds.

## Results

### **Absence of RNase HI prevents accumulation of hypernegative supercoiling associated with a *topA* deficiency.**

We previously described the effects of topoisomerase I defects in living cells using a set of *E. coli* strains in which a temperature-sensitive gyrase mutation allows the growth of *topA* null cells at 37°C but not at 28°C owing to reactivation of gyrase (Drolet *et al.*, 1995). In such strains hypernegatively supercoiled DNA accumulates following the temperature downshift unless RNase HI is overproduced (Massé and Drolet, 1999c). Overproduction of RNase HI at 28°C also restores growth. To better understand relationships among hypernegative supercoiling, R-loops, and growth inhibition, we constructed a conditional *topA rnhA* double mutant (transduction was used to introduce an *rnhA::cam* allele into a *topA20::Tn10 gyrB(Ts)* strain carrying a plasmid expressing *rnhA* under control of the arabinose-inducible P<sub>BAD</sub> promoter). Transductants were obtained by plating at 37°C in the presence but not in the absence of arabinose (not shown). When these transductants were transferred to liquid medium lacking arabinose, cells grew slowly, cell filamentation occurred, and culture growth stopped prematurely, irrespective of temperature (not shown). Thus, when RNase HI is absent, the growth defects of *topA* null *gyrB(Ts)* mutants were seen even at 37°C. Since colonies arose after plating on solid medium containing arabinose, we conclude that deleting *rnhA* in *topA* mutants is bacteriostatic, not bactericidal (not shown).

Supercoiling was measured with plasmid pGB2*nusB::kan*, a low copy-number derivative of pSC101 that is prone to R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *topA* null mutants (Broccoli *et al.*, 2004). Plasmid topoisomers were resolved using agarose gel electrophoresis in the presence of 7.5 µg/ml of chloroquine, as previously described (Massé and Drolet, 1999c). Under this condition the more relaxed topoisomers migrated faster; hypernegatively supercoiled DNA also migrated rapidly. With a *gyrB(Ts)* control strain lacking only *topA* (strain PS152), hypernegatively supercoiled DNA accumulated after transfer of cells from 37 to 28°C (Fig. 1a, lane 2, indicated by [--]). When an *rnhA* null mutation was added (strain PS151, which also

carried an inducible *rnhA* gene), and mutant cells from arabinose-containing agar were incubated overnight at 37°C in the absence of arabinose, followed by 1:1000 dilution into medium lacking arabinose, cell growth was sufficient for examination of plasmid supercoiling. A portion of the DNA was more relaxed at 37°C than in *topA* single mutant cells (Fig. 1a, compare lanes 1 and 3), and hypernegatively supercoiled DNA failed to accumulate following a transfer to 28°C (Fig. 1a, lane 4). The relaxed portion of topoisomers remained extensively relaxed following the temperature downshift (Fig. 1a, lanes 3 and 4, indicated by [rel]). These extensively relaxed topoisomers were not observed in wild-type (lanes 5 and 6) or in *gyrB*(Ts) (lanes 7 and 8) cells. Thus, removal of *rnhA* from a *topA*-deficient strain caused DNA relaxation and loss of hypernegative supercoiling.

When arabinose was added to the diluted (1:1000) overnight culture of the *topA rnhA* double mutant (strain PS151) to produce RNase HI from a plasmid-borne gene, supercoiling was restored at 37°C (Fig. 1a, compare lane 3, no arabinose, with lane 9, 0.05% arabinose) and accumulation of hypernegatively supercoiled DNA occurred following a temperature downshift (Fig. 1a, lane 10). Since RNase HI was overproduced in this experiment, *topA* null cells accumulated lower amounts of hypernegatively supercoiled DNA than observed with *topA* null cells having only wild-type levels of RNase HI (Fig. 1a, compare lanes 2, *topA* null cells, and 10, *topA rnhA* double mutant with 0.05% arabinose).

Two-dimensional gel electrophoresis confirmed the presence of hypernegatively supercoiled and extensively relaxed DNA, respectively, in the presence and absence of RNase HI (Fig. 1b; hypernegatively supercoiled DNA is seen at bottom part of the curves at high chloroquine concentration ((right panels, indicated by [--])); extensively relaxed DNA is at the far right part of the curves at lower chloroquine concentration (left and middle panels; lines were traced over the more relaxed topoisomers)). Additional two-dimensional gel analyses showed that the more relaxed topoisomers were not positively supercoiled (data not shown). Thus, removal of RNase HI relaxed DNA of *topA* null cells and prevented the accumulation of hypernegatively supercoiled DNA rather than increasing it.

### **Supercoiling deficit in a *topA rnhA* null double mutant after transcription inhibition.**

Excess negative supercoiling in *topA* mutants originates largely from transcription. To determine whether the reduced supercoiling in the *topA rnhA* double mutant is specific to transcription-induced supercoiling, mutant cells (strain PS151) were treated with rifampicin, an inhibitor of RNA polymerase. When rifampicin was added to a culture of *topA* null cells (strain PS152, containing wild-type RNase HI) before the temperature downshift, almost all of the hypernegatively supercoiled topoisomers were lost (Fig. 2, top panels). When RNase HI was absent and most of the DNA was seen as extensively relaxed topoisomers, rifampicin had little effect (Fig. 2, bottom panels; a line was traced over the more relaxed topoisomers). Thus the extensive relaxation of supercoiling seen in *topA rnhA* double mutants was related to global supercoiling rather than being specifically linked to transcription. However, our results also show that the effect of the *rnhA* deletion on supercoiling following a temperature downshift was much stronger when transcription was allowed (Fig. 2, compare –rif with +rif, + and – RNase HI).

### **Levels of topoisomerase IV and gyrase proteins are not altered by deletion of *rnhA* from *topA* null cells.**

Changes in topoisomerase IV and gyrase concentrations were measured to address the possibility that levels of these proteins account for the extensive DNA relaxation associated with depletion of RNase HI activity in *topA* null cells. ParC and ParE were not overproduced in the *topA20::Tn10 gyrB* (Ts) mutant when RNase HI was depleted, as assessed by western blot experiments (Fig. 3, compare lanes 5 and 6 with lanes 7 and 8) and northern blot experiments (data not shown). GyrA and GyrB levels also exhibited no significant difference between the presence and absence of RNase HI (Fig. 3, compare lanes 5 and 6 with lanes 7 and 8).

Lack of significant change in ParC, ParE, GyrA and GyrB level was also observed when the *rnhA* gene was inactivated in the  $\Delta$ *topA gyrB* (Ts) strain carrying pPH1243 (Fig. 3, lanes 1 to 4). This plasmid, which expressed *topB* (topoisomerase

III) from an IPTG-inducible promoter, allowed the recovery of *rnhA::cam* transductants in a  $\Delta topA$  recipient strain, but only when IPTG was present (Fig. 4a and data not shown). Western blot experiments with a transductant (strain SB383) confirmed that overproduction of topoisomerase III occurred (Fig. 4b). Plasmid pPH1243 also allowed *topA rnhA* double mutants to grow unless cultures were diluted into IPTG-deficient medium, in which case growth eventually stopped during log phase. Thus, introduction of two restrictive conditions, depletion of RNase HI or removal of topoisomerase III overexpression failed to reveal changes in gyrase and topoisomerase IV concentrations that could explain the extensive DNA relaxation observed with *topA rnhA* double mutants.

**Supercoiling in a *topA rnhA* double mutant is not significantly affected by quinolone-mediated inhibition of topoisomerase IV.**

We also considered the possibility that supercoiling by gyrase was reduced. To test this hypothesis, we used the *gyrA<sup>L83</sup>* allele to render gyrase resistant to norfloxacin, thereby allowing selective quinolone-mediated inhibition of topoisomerase IV, the only remaining relaxing activity in *topA* mutants (Zechiedrich *et al.*, 2000). The *gyrA<sup>L83</sup>* allele was introduced into isogenic  $\Delta topA$  *gyrB* (Ts) and  $\Delta topA$  *gyrB* (Ts) *rnhA::cam* strains carrying pPH1243 to obtain, respectively, strains VU21 and PS160. Dilution into medium lacking IPTG gradually removed suppression of growth defect by topoisomerase III, but allowed enough growth for examination of plasmid supercoiling (as pointed out in a subsequent section, topoisomerase III overexpression has no effect on supercoiling).

Negative supercoiling increased at 37°C after inhibition of topoisomerase IV by norfloxacin in both the *topA rnhA* and the *topA* mutants following dilution (Fig. 5, compare *topA rnhA*, strain PS160, lanes 1 and 2 with *topA*, strain VU21, lanes 5 and 6). However, a significant proportion of the topoisomers remained relaxed in the *topA rnhA* mutant (Fig. 5, lane 2, indicated by [rel]). Following a shift to 28°C, the addition of norfloxacin to inhibit topoisomerase IV strongly stimulated the accumulation of hypernegatively supercoiled DNA in the *topA* mutant (Fig. 5, compare lanes 7 and 8, indicated by [--]), whereas it did not appreciably change the



supercoiling level in the *topA rnhA* mutant (Fig. 5, compare lanes 3 and 4). Collectively these results show that topoisomerase IV is not responsible for the strong supercoiling deficit in *topA rnhA* double mutants. It is likely that supercoiling by gyrase is impaired when both RNase HI and topoisomerase I are absent.

**GyrI, a gyrase inhibitor, is not involved in supercoiling inhibition found in a *topA rnhA* double mutant.**

GyrI is encoded by *sbmC*, a well-characterized inhibitor of gyrase (Nakanishi *et al.*, 1998; Chatterji and Nagaraja, 2002). Since GyrI is part of the SOS regulon (Baquero *et al.*, 1995), which is chronically expressed in *rnhA* mutants (Kogoma *et al.*, 1993; McCool *et al.*, 2004), it is expected to be at elevated levels in *topA rnhA* double mutants. To examine involvement of GyrI in the supercoiling inhibition in *topA rnhA* double mutants, an *sbmC::kan* allele was introduced into isogenic  $\Delta topA$  *gyrB*(Ts) and  $\Delta topA$  *gyrB*(Ts) *rnhA::cam* strains carrying pPH1243, to obtain, respectively, strains VU64 and VU70. Both extensive DNA relaxation and lack of hypernegative supercoiling, which are characteristic of the *topA rnhA* double mutant, were seen whether or not *sbmC* was present (Fig. 6, compare lanes 1 and 4 with lanes 2 and 5, respectively). The lack of a significant supercoiling effect from the absence of GyrI was also illustrated by comparing supercoiling in strains VU64 (Fig. 6, *rnhA*<sup>+</sup>, lanes 3 and 6) and VU70 (Fig. 6, *rnhA*<sup>-</sup>, lanes 2 and 5). Thus, GyrI is not responsible for the DNA relaxation seen in *topA rnhA* double mutants. We also examined a *lexA3* mutant in which the SOS regulon is non-inducible. DNA was relaxed, and hypernegative supercoiling was absent in a *lexA3 topA rnhA* mutant (not shown).

**Cell extracts of a *topA rnhA* double mutant exhibit no supercoiling activity and significantly inhibit supercoiling of wild-type cell extracts.**

The restoration of negative supercoiling is slow and requires a significant increase in the population cell density of strain PS151 (*topA rnhA* double mutant carrying pBAD*rnhA*) following the addition of arabinose to produce RNase HI (not shown). This result suggested involvement of one or more stable factors in inhibiting

supercoiling in *topA rnhA* double mutants. To test this idea, we prepared extracts of wild-type (strain AQ634), *gyrB(Ts)* (strain MA249), *gyrB(Ts) topA* (strain PS152) and *gyrB(Ts) topA rnhA* (strain PS151) cells. Extracts from both wild-type and *gyrB(Ts)* strains exhibited supercoiling activity (Fig. 7a), although with the *gyrB(Ts)* strain an endonuclease activity was also detected (lane 6). Maximum supercoiling activity was seen at 3.5  $\mu\text{g}$  total protein in the reaction mixture for the *gyrB(Ts)* strain (lane 9); the same amount of protein from wild-type cells exhibited more supercoiling activity (compare wild-type, lane 4 with *gyrB(Ts)*, lane 9), and a higher supercoiling level was achieved (not shown). Although supercoiling activity was also detected in crude extracts of *topA* null *gyrB(Ts)* cells (Fig. 7b, lanes 7 to 12, top panel), it was significantly lower than in extracts of isogenic *topA*<sup>+</sup> *gyrB(Ts)* cells (Fig. 7a, lanes 6 to 10) and was better seen when the gel was probed with a [<sup>32</sup>P]-labelled DNA fragment (Fig 7b, lanes 7 to 12, bottom panel). Even with radioactive probing, supercoiling activity was undetectable in extracts from the *topA rnhA* double mutant grown in the absence of arabinose to deplete RNase HI activity (Fig. 7b, lanes 1 to 6, bottom panel). These results are consistent with crude extracts of *topA rnhA* null cells containing factor(s) that significantly reduce supercoiling activity.

As a further test for factor(s) inhibiting supercoiling, aliquots of extracts from both *topA* and *topA rnhA* double mutant cells were mixed with extracts from wild-type cells. As shown in Fig. 7c, extracts from the *topA rnhA* double mutant significantly inhibited supercoiling activity of wild-type extracts (compare lanes 1 and 5, which used 2.5  $\mu\text{g}$  protein from the wild-type cell extract with, respectively, 5 and 0  $\mu\text{g}$  protein from the *topA rnhA* double mutant extract). In contrast, inhibition of supercoiling activity by the extract from *topA* null cells was weak (Fig. 7c, compare lanes 1 and 6, using 2.5  $\mu\text{g}$  protein from the wild-type cell extract with 5  $\mu\text{g}$  protein from the *topA rnhA* or the *topA* null extracts). Thus, a strong inhibitory activity present in extracts of *topA rnhA* double mutant explains the failure to detect supercoiling activity and may explain, at least in part, the impairment of supercoiling by gyrase in *topA rnhA* double mutants.

**Topoisomerase III overproduction complements the growth defect of a *topA rnhA* double mutant without restoring supercoiling.**

The data described above failed to relate the growth defect of *topA rnhA* double mutants to excess negative supercoiling. Since in *E. coli* topoisomerase III is not involved in the regulation of supercoiling (Zechiedrich *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2005), we expected DNA of *topA rnhA* double mutants to remain relaxed during suppression of growth defect by overexpression of topoisomerase III. To test this hypothesis we made use of the finding that in a *topA* null mutant hypernegative supercoiling of pPH1243 is stimulated both by transcription from the strong *P<sub>trc</sub>* promoter, which is activated by the addition of IPTG, and by translation inhibitors (Broccoli *et al.*, 2004; Broccoli and Drolet, unpublished results; spectinomycin was added 15 min before shifting from 37 to 28°C). In one experimental set, IPTG was added throughout growth at 37°C to overexpress topoisomerase III; in the second set, IPTG was added after spectinomycin so that the transcription effect of IPTG on pPH1243 supercoiling could be observed in the absence of excess topoisomerase III. Fig. 8 shows that pPH1243 exhibited hypernegative supercoiling upon adding IPTG, either before (lane 2) or after (lane 6) the addition of spectinomycin to the *topA* null mutant. In contrast, relaxation of pPH1243 was observed whether or not topoisomerase III was overproduced and irrespective of the presence of spectinomycin in the *topA rnhA* double mutant (Fig. 8, lanes 3, 4, 7 and, 8). Two-dimensional gel electrophoresis confirmed relaxation of pPH1243 (data not shown). As expected, supercoiling was restored in this *topA rnhA* double mutant following the introduction of a plasmid carrying the *rnhA* gene (data not shown), indicating that relaxation is reversible and due to the absence of RNase HI. Collectively, these data support the assertion that overexpression of topoisomerase III suppresses the growth defect of *topA rnhA* double mutants without restoring supercoiling.

**Cells of a *topA rnhA* double mutant form long filaments packed with unevenly distributed DNA.**

Despite the presence of a mechanism to prevent hypernegative supercoiling, *topA rnhA* double mutants do not grow without suppression. This result suggests the

presence of supercoiling-independent mechanism(s) by which the absence of RNase HI dramatically perturbs cell physiology. As shown above, the growth defect of a *topA rnhA* double mutant can be rescued by overproducing topoisomerase III (Fig. 4), which can allow chromosome segregation by removing precatenanes during replication (Nurse *et al.*, 2003). We therefore examined the possibility that the growth inhibition of *topA rnhA* double mutants might be related to segregation defects.

Cells were stained with DAPI and prepared for fluorescence microscopy such that both cell morphology and DNA content could be examined. In the absence of topoisomerase III overproduction, cells of the *topA rnhA* double mutant (strain SB383) formed long filaments full of DNA, and nucleoid structures were altered (Fig. 9a, panel 2). Anucleate cells also accumulated (Fig. 9b, yellow arrows), as did cells with very low amounts of chromosomal DNA (Fig. 9b, green arrows). Formation of such cells could result from septum closure on nucleoids, a typical manifestation of partition defects (guillotine effect; Niki *et al.*, 1991). Clearly, the *topA rnhA* double mutant fails to produce a significant number of normal cells. However, more than half of the cells containing aberrant nucleoid structures likely remain viable, as cells of strain SB383 incubated in liquid medium lacking IPTG form colonies when plated on solid media containing IPTG to overproduce topoisomerase III (data not shown). Overproduction of topoisomerase III reduced both cell filamentation and DNA content, and it caused DNA to be more regularly distributed within the cells (Fig. 9a, panel 1). Topoisomerase III overproduction also reduced the number of anucleate cells by more than half. Segregation defects were also apparent in the *topA20::Tn10 rnhA::cam gyrB* (Ts) mutant carrying pBAD*rnhA* (strain PS151; Fig. 9a, panel 4, -ara); they were corrected by the addition of arabinose to produce RNase HI (panel 3, +ara). Moreover, cells of single *rnhA* and *topA* null mutants failed to show major morphological or nucleoid defects (Fig. 9c, panels 2 and 3 respectively). Thus, combinations of *topA* and *rnhA* null mutations lead to phenotypes reminiscent of segregation defects, thereby explaining the growth inhibition phenotype of *topA rnhA* double mutants.

## Discussion

The work described above, which focused on the properties of *topA rnhA* double mutants, revealed new features of how DNA topology is regulated in bacterial cells. One level concerns DNA supercoiling. Basal supercoiling, which is defined as supercoiling in the absence of transcription (Drlica *et al.*, 1988), is set largely by the supercoiling activity of gyrase opposed by the relaxing activities of topoisomerase I and topoisomerase IV. Transcription, through the generation of R-loops coupled with gyrase activity, produces hypernegative supercoiling that is countered by topoisomerase I and RNase HI. The growth defect associated with a deficiency of topoisomerase I is suppressed by partially defective gyrase, overexpression of topoisomerase IV, or overexpression of RNase HI. Surprisingly, *topA rnhA* null double mutants not only lacked hypernegative supercoiling but also contained DNA that was relaxed (Fig. 1 and 8). Evidence was found for the interesting possibility that RNase HI normally regulates factor(s) impairing supercoiling by gyrase. A second level of topology control concerns decatenation of replicated chromosomes. Decatenation is largely a function of topoisomerase IV (Zechiedrich and Cozzarelli, 1995). In our work, a *topA rnhA* double mutant exhibited a defect in chromosome segregation that was corrected by overexpression of topoisomerase III (Fig. 9), an enzyme that has no effect on supercoiling and is capable of decatenation both *in vitro* and *in vivo* (Hiasa *et al.*, 1994; Nurse *et al.*, 2003). Thus RNase HI, either directly or indirectly, influences both basal levels of supercoiling and chromosome segregation as discussed in the following sections.

### **Supercoiling in *topA rnhA* double mutants.**

Previous work showed that gyrase-mediated hypernegative supercoiling occurs during transcription *in vitro* in the absence of RNase HI (Drolet *et al.*, 1994; Phoenix *et al.*, 1997) and in *topA* null mutants when RNase HI is not overproduced (Massé and Drolet, 1999c). We expected removal of *rnhA* from *topA* mutants to lead to extensive hypernegative supercoiling, since cells lacking both topoisomerase I and RNase HI cannot be constructed (Massé and Drolet, 1999c; Drolet *et al.*, 1995). Unexpectedly, hypernegative supercoiling failed to accumulate in *topA rnhA* double

mutants that had been constructed by conditional expression of *rnhA* or *topB*. However, DNA of such mutants was more relaxed than usual. Relaxation was not an indirect consequence of cell death, because deleting *rnhA* in *topA* null mutants was bacteriostatic, not bactericidal. When arabinose was added to non-growing *topA rnhA* null cells carrying pBAD*rnhA* to induce the synthesis of RNase HI, both growth and supercoiling were restored. More importantly, DNA remained extensively relaxed in a *topA rnhA* double mutant when cell growth was restored by overproducing topoisomerase III. Only when a plasmid carrying *rnhA* was introduced into this mutant that supercoiling was also restored. Therefore, DNA relaxation correlated with depletion of RNase HI activity in *topA* mutants.

Since supercoiling level is set primarily by opposing topoisomerase activities, we considered the possibility that the supercoiling deficit in *topA rnhA* null double mutants was due either to an excess of DNA relaxation activity by topoisomerases or to a loss of gyrase supercoiling activity. One well established mechanism by which excess negative supercoiling is prevented in *topA* mutants is the overproduction of topoisomerase IV (Kato *et al.*, 1990; Free and Dorman, 1994). However, western blot experiments showed that topoisomerase IV is not overproduced in *topA* null cells lacking RNase HI activity. Moreover, inhibition of topoisomerase IV by norfloxacin failed to significantly raise supercoiling in a *topA rnhA* double mutant carrying the *gyrA*<sup>L83</sup> quinolone-resistance allele. Thus topoisomerase IV was not responsible for the supercoiling deficit in *topA rnhA* double mutants. In agreement with the results of previous experiments showing that topoisomerase III is not involved in supercoiling regulation in *E. coli* (Zechiedrich *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2005), overproducing this enzyme had no effect on supercoiling in either *topA* single or *topA rnhA* double mutants. Therefore, relaxation activity of topoisomerases is unlikely to explain the supercoiling deficit in *topA* null cells depleted of RNase HI activity.

Western blot experiments also demonstrated that levels of gyrase protein were not altered following the depletion of RNase HI activity in *topA* mutants. Two experiments indicated that the supercoiling deficit is related to impairment of supercoiling by gyrase. First, while inhibiting topoisomerase IV by norfloxacin in a

single *topA* null mutant strongly promoted hypernegative supercoiling, it did not significantly stimulate supercoiling in a double *topA rnhA* null mutant. Second, supercoiling activity could not be detected in cell extracts of a *topA rnhA* null double mutant (strain PS151), and these extracts significantly inhibited the supercoiling activity when mixed with extracts from wild-type cells. Thus, the supercoiling deficit in *topA* null cells depleted of RNase HI activity is likely related to a cellular response that leads to the inhibition of gyrase.

The cellular response leading to the impairment of gyrase activity in double *topA rnhA* null mutants is currently unknown. The response is related neither to the SOS regulon, which is constitutively induced in the absence of RNase HI (Kogoma *et al.*, 1993; McCool *et al.*, 2004), nor to the presence of the gyrase inhibitor, GyrI, a member of the SOS regulon (Baquero *et al.*, 1995). Previous results also failed to demonstrate an effect of GyrI on supercoiling *in vivo* (Chatterji *et al.*, 2003). While supercoiling by gyrase can be prevented by a direct interaction between the enzyme and a specific inhibitor acting like GyrI, it may also be inhibited by low [ATP]/[ADP] (Westerhoff *et al.*, 1998; Drlica, 1992) and indirectly by proteins that interact with DNA, such as the abundant nucleoid proteins Fis, H-NS and HU (Travers and Muskhelishvili, 2005ab). Additional experiments are required to work through the many possible ways in which gyrase activity can be lowered.

### **Segregation defect and growth inhibition suppressed by topoisomerase III.**

The growth inhibition associated with *topA rnhA* double mutants correlated with phenotypes seen previously with chromosomal segregation defects: extensive cell filamentation, abnormal nucleoid structures, and accumulation of anucleate cells. Thus, the simultaneous absence of topoisomerase I and RNase HI leads to segregation defects not observed with cells lacking only one of the enzymes. R-loops may be involved, since a relationship between topoisomerase I and RNase HI is well established. If R-loops persist in *topA rnhA* double mutants, particularly at *oriK* sites where constitutive, stable DNA replication is initiated (Kogoma, 1997), excess replication could occur. Over-replication may saturate the segregation capacity of the

cell, thus requiring more decatenation activity than can be provided by excess topoisomerase III.

Unregulated over-replication is also known to lead to collapse of replication forks, DNA double-strand breaks (Kouziminova *et al.*, 2004; Simmons *et al.*, 2004; Michel *et al.*, 2007), and ultimately hyper-recombination, which can cause segregation defects (Lopez *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2001; Zahradka *et al.*, 1999; Magner *et al.*, 2007). Accumulation of unresolved recombination intermediates interferes with chromosome segregation; resolution of these structures can be performed by topoisomerase III (Lopez *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2001), even when it is present at normal or very low levels (less than 10 copies per cell; Digate and Marians, 1989).

The extensive DNA relaxation in *topA rnhA* double mutants could also contribute to segregation defects, since the inhibitory effect of temperature-sensitive gyrase mutations on segregation (Steck and Drlica, 1984) is thought to be due to DNA relaxation that then suppresses decatenation by topoisomerase IV (Zechiedrich *et al.*, 1997; Holmes and Cozzarelli, 2000). Overproduction of topoisomerase III allows chromosome segregation when topoisomerase IV is inactive (Nurse *et al.*, 2003). However, in the context of extensive DNA relaxation, the ability of topoisomerase III to perform decatenation might be reduced because single-stranded DNA regions, the substrate for topoisomerase III, are expected to be infrequent. Such regions can also be provided by R-loops (Broccoli *et al.*, 2000).

### **Biological function of RNase HI**

The first function attributed to RNase HI in *E. coli* was a role in the removal of RNA primers of Okazaki fragments (Funnell *et al.*, 1986; Ogawa and Okazaki, 1984). However, this enzyme cannot remove the last ribonucleotides at the RNA-DNA junctions. In fact, 5'-3' exonuclease activity (e.g. polymerase I) plays the major role in the removal of RNA primers. Interestingly, RNase H activity in various bacterial species was recently shown to be dispensable for complete RNA primer removal (Fukushima *et al.*, 2007). Only 5'-3' exonuclease activity was shown to be



indispensable for this process. Based on the results presented in the present work we propose that a major function of RNase HI, and possibly other bacterial RNase H molecules, involves the control of DNA topology via R-loops.

## Experimental procedures

***E. coli* strains.** *Escherichia coli* strains used in this work are described in Table 1. Strains were constructed by transduction with phage P1*vir* as previously described (Miller, 1992). When needed, tetracycline (10 µg/ml), chloramphenicol (15 µg/ml) or kanamycin (50 µg/ml) was added to the medium. PCR was used to confirm the presence of only the *rnhA::cam* allele and the *sbmC::kan* allele, respectively, on the chromosome of the *rnhA* null and the *sbmC* null transductants.

**Plasmids.** pBAD18*rnhA* was constructed by placing an EcoRI-HindIII fragment carrying the *rnhA* gene under the control of the P<sub>BAD</sub> promoter of pBAD18 (Guzman *et al.*, 1995). The *rnhA* gene was obtained by PCR from pSK760 (Drolet *et al.*, 1995) by using d(GTCAGAATTCCAGGAAGTCTACCAGA) and d(GTCAAAGCTTGGCAATGTCGTAAACC) oligonucleotides. pGB2*nusB::kan* is a pSC101 derivative that was constructed by inserting the pUC4K EcoRI fragment carrying a kanamycin-resistance cassette into the ScaI site of pGB2*nusB* (Friedman *et al.*, 1990). pPH1243 is a pTrc99a derivative carrying the *topB* gene under the control of the IPTG-inducible *Ptrc* promoter (Broccoli *et al.*, 2000).

**Plasmid extraction for supercoiling analysis.** Cells were grown overnight at 37°C in LB medium supplemented with cysteine (50 µg/ml, for the RFM475 derivatives), thymine (10 µg/ml, for the MA251 derivatives) or tryptophan (50 µg/ml, for VU35 and VU95 strains). When required, ampicillin (50 µg/ml), spectinomycin (30 µg/ml), arabinose (0.05%) or IPTG (1 mM) were added. Overnight cultures diluted in pre-warmed medium (37°C), were grown to an OD<sub>600</sub> of ~0.5 at which time an aliquot of cells was recovered for plasmid extraction while the remaining culture was transferred to 28°C. Aliquots of cells were recovered for plasmid extraction at the indicated times. Growth was arrested by transferring cells into a tube filled with ice, thus immediately lowering the temperature of the culture to 0°C. Plasmid DNAs were extracted by alkaline lysis as previously described (24). For experiments using derivatives of MA251, overnight cultures were diluted 1:1000; they were diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.03 for the experiments using SB383, VU21, PS160, VU64, and VU70.

**Plasmid topoisomer analysis.** One-dimensional and two-dimensional agarose gel electrophoresis in the presence of chloroquine was performed in 0.5 X TBE as described (Massé *et al.*, 1997). After electrophoresis, the gels were dried and prepared for *in situ* hybridization with random prime-labelled probes as described (Massé *et al.*, 1997). Images were obtained by using a Phosphorimager Typhoon 9400 (Amersham Biosciences).

**Western blot analysis.** The equivalent of 200 µl of cell culture at an OD<sub>600</sub> of 0.7 was used for Western blot analysis. The cell pellets were lysed by boiling in sodium dodecyl sulphate (SDS). The proteins were separated by SDS-polyacrylamide (7.5 %) gel electrophoresis. Western blots were performed as described previously (Sambrook *et al.*, 1989) by using nitrocellulose membranes (Hybond-ECL, GE Healthcare). After transfer, the membranes were stained with Ponceau S (Fisher Scientific) to confirm that similar amounts of protein were loaded in each lane. ParC and ParE antibodies were obtained from Dr Kenneth J. Mariani (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, New York). GyrA and GyrB antibodies were purchased from John Innes Enterprises Ltd (John Innes Centre, Norwich Research Park Colney, Norwich, UK). TopB antibodies were obtained from Dr Russell DiGate (Department of Pharmaceutical Sciences, Philadelphia College of Pharmacy, Philadelphia, PA). The ECL Plus detection kit (GE Healthcare) was used to reveal the specific proteins.

**Gyrase assays in crude cell extracts.** Cells were grown in LB medium at 37<sup>0</sup>C to an OD<sub>600</sub> of 0.7 and transferred to 28<sup>0</sup>C for 30 minutes. Cells were recovered and prepared for gyrase assays in crude extracts as previously described (DiNardo *et al.*, 1982). 0.2 µg of relaxed pBR322 DNA (prepared by using wheat germ topoisomerase I from Sigma-Aldrich) was used in the assays.

**Microscopy.** RFM443, RFM475, PH379 and SB383 cells were grown overnight on LB plates supplemented, when required, with cysteine (50 µg/ml), ampicillin (50 µg/ml), chloramphenicol (10 µg/ml) and/or tetracycline (10 µg/ml). When needed,

IPTG (1 mM) was added to the plates of SB383 cells. PS151 cells were grown overnight on LB plates supplemented with thymine (50 µg/ml) and, when needed, arabinose (0.05%). The plates were incubated at 37 °C. After overnight growth, cells were resuspended in pre-warmed (37 °C) liquid LB medium (supplemented as requested) to obtain a starting OD<sub>600</sub> of about 0.01. Cells were grown at 37 °C to an OD<sub>600</sub> of 0.8. 150 µl of cells were harvested, centrifuged, and resuspended in 77% ethanol (fixing solution). The cells were washed with 500 µl of 0.9% NaCl, centrifuged and resuspended in 100 µl of 0.9% NaCl. 3 µl of the fixed samples were spread on slides pre-treated with a Poly-L-Lysine solution (Sigma) and allowed to air dry at room temperature. 5 µl of slow fade gold antifade reagent with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; from Invitrogen) was deposited on the slides and sealed with a cover glass. Fluorescence pictures were obtained with a Nikon E600 equipped with a 100-W mercury lamp and standard DAPI filters using the X100 oil immersion objective. The images were captured on the computer using the Nikon ACT-1 software. Exposure time was 1/50s at maximum sensitivity. For phase contrast microscopy, the microscope was adjusted to the phase contrast optical system and pictures were taken at X100 oil immersion objective with the Ph3 annulus. Exposure time was 1/120s at normal sensitivity. The images were processed with Adobe Photoshop.

## References

- Baaklini, I., Hraiky, C., Rallu, F., Tse-Dinh, Y.-C. and Drolet, M (2004) RNase HI is required for efficient full-length RNA synthesis in the absence of topoisomerase I in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **54**: 198-211.
- Baquero, M.R., Bouzon, M., Varea, J. and Moreno, F. (1995) *sbmC*, a stationary-phase induced SOS *Escherichia coli* gene, whose product protects cells from the DNA replication inhibitor microcin B17. *Mol Microbiol* **18**: 301-311.
- Broccoli, S., Phoenix, P., and Drolet, M. (2000) Isolation of the *topB* gene encoding DNA topoisomerase III as a multicopy suppressor of *topA* null mutations in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **35**: 58-68.
- Broccoli, S., Rallu, F., Sanscartier, P., Cerritelli, S.M., Crouch, R.J. and Drolet, M (2004) Effects of RNA polymerase modifications on transcription-induced supercoiling and associated R-loop formation. *Mol Microbiol* **52**: 1769-1779.
- Chatterji, M., and Nagaraja, V. (2002) GyrI: a counter-defensive strategy against proteinaceous inhibitors of DNA gyrase. *EMBO Rep.* **3**: 261-267.
- Chatterji M., Sengupta S. and Nagaraja, V. (2003) Chromosomally encoded gyrase inhibitor GyrI protects *Escherichia coli* against DNA-damaging agents. *Arch Microbiol* **180**: 339-346.
- DiGate, R.J. and Marians, K.J. (1989) Molecular cloning and DNA sequence analysis of *Escherichia coli topB*, the gene encoding topoisomerase III. *J Biol Chem* **264**: 17924-17930.
- DiNardo, S., Voelkel, K.A., Sternglanz, R., Reynolds, A.E. and Wright, A (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell* **31**: 43-51.
- Drlica, K., Franco, R.J. and Steck, T.R. (1988) Rifampin and *rpoB* mutations can alter DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**: 4983-4985.
- Drlica, K. (1992) Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol Microbiol* **6**: 425-433.
- Drolet, M. (2006) Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. *Mol Microbiol* **59**: 723-730.
- Drolet, M., Bi, X. and Liu, L.F (1994) Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation *in vitro*. *J Biol Chem* **269**: 2068-2074.

- Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., Massé, E., Liu, L.F. and Crouch, R.J (1995) Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* delta *topA* mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3526-3530.
- Free, A. and Dorman, C. J. (1994) *Escherichia coli* *tyrT* gene transcription is sensitive to DNA supercoiling in its native chromosomal context: effect of DNA topoisomerase IV overexpression on *tyrT* promoter function. *Mol Microbiol* **14**: 151-161.
- Friedman, D.I., Olson, E.R., Johnson, L.L., Alessi, D., and Craven, M.G. (1990) Transcription-Dependent Competition for a Host Factor - the Function and Optimal Sequence of the Phage-Lambda-Boxa Transcription Antitermination Signal. *Genes Dev* **4**: 2210-2222.
- Fukushima, S., Itaya, M., Kato, H., Ogasawara, N. and Yoshikawa, H. (2007) Reassessment of the *in vivo* functions of DNA polymerase I and RNase H in bacterial cell growth. *J. Bacteriol.* **189**: 8575-8583.
- Funnell, B.E., Baker, T.A. and Kornberg, A (1986) Complete enzymatic replication of plasmids containing the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J Biol Chem.* **261**: 5616-5624.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., and Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **177**: 4121-4130.
- Hiasa, H., DiGate, R.J. and Marians, K.J. (1994) Decatenating activity of *Escherichia coli* DNA gyrase and topoisomerases I and III during *oriC* and pBR322 DNA replication *in vitro*. *J Biol Chem* **269**: 2093-2099.
- Holmes, V.F., and Cozzarelli, N.R. (2000) Closing the ring: Links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 1322-1324.
- Hraiky, C., Raymond, M.A. and Drolet, M (2000) RNase H overproduction corrects a defect at the level of transcription elongation during rRNA synthesis in the absence of DNA topoisomerase I in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **275**: 11257-11263.
- Itaya, M., and Crouch, R.J. (1991) Correlation of activity with phenotypes of *Escherichia coli* partial function mutants of *rnh*, the gene encoding RNase H. *Mol Gen Genet* **227**: 433-437.

- Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S. and Suzuki, H (1990) New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* **63**: 393-404.
- Kogoma, T., Hong, X., Cadwell, G.W., Barnard, K.G. and Asai, T. (1993) Requirement of homologous recombination functions for viability of the *Escherichia coli* cell that lacks RNase HI and exonuclease V activities. *Biochimie* **75**:89-99.
- Kogoma, T. (1997) Stable DNA replication: interplay between DNA replication homologous recombination, and transcription. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 212-238.
- Kouzminova, E.A., Rotman, E., Macomber, L., Zhang, J. and Kuzminov, A. (2004) RecA-dependent mutants in *Escherichia coli* reveal strategies to avoid chromosomal fragmentation. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:16262-16267.
- Lopez, C.R., Yang, S., Deibler, R.W., Ray, S.A., Pennington, J.M., DiGate, R.J., Hastings, P.J., Rosenberg, S.M., and Zechiedrich, E.L. (2005) A role for topoisomerase III in a recombination pathway alternative to RuvABC. *Mol. Microbiol.* **58**: 80-101.
- Magner, D.B., Blankschien, M.D., Lee, J.A., Pennington, J.M., Lupski, J.R. and Rosenberg, S.M. (2007) RecQ Promotes Toxic Recombination in Cells Lacking Recombination Intermediate-Removal Proteins. *Mol Cell* **26**:273-286.
- Massé, E. and Drolet, M. (1999a) Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, **274**, 16654-16658.
- Massé, E., Drolet, M (1999b) R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *Escherichia coli topA* mutants preferentially occurs at low temperatures and correlates with growth inhibition. *J Mol Biol* **294**: 321-332.
- Massé, E., Drolet, M (1999c) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J Biol Chem* **274**: 16659-16664.
- Massé, E., Phoenix, P. and Drolet, M (1997) DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the *rrnB* operon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **272**: 12816-12823.

- McCool, J.D., Long, E., Petrosino, J.F., Sandler, H.A., Rosenberg, S.M. and Sandler, S.J. (2004) Measurement of SOS expression in individual *Escherichia coli* K-12 cells using fluorescence microscopy. *Mol Microbiol* **53**:1343-1357.
- Menzel, R., and Gellert, M. (1983) Regulation of the Genes for *Escherichia Coli* DNA Gyrase - Homeostatic Control of DNA Supercoiling. *Cell* **34**: 105-113.
- Michel, B., Boubakri, H., Baharoglu, Z., Lemasson, M. and Lestini, R. (2007) Recombination proteins and rescue of arrested replication forks. *DNA Repair (Amst)* **6**: 967-980.
- Miller, J.H. (1992) A Short Course in Bacterial Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.
- Nakanishi, A., Oshida, T., Matsushita, T., Imajoh-Ohmi, S. and Ohnuki, T. (1998) Identification of DNA gyrase inhibitor (GyrI) in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **273**:1933-1938.
- Niki, H., Jaffe, A., Imamura, R., Ogura, T. and Hiraga, S. (1991) The new gene *mukB* codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. *EMBO J* **10**:183-193.
- Nurse, P., Levine, C., Hassing, H and Marians, K.J. (2003) Topoisomerase III can serve as the cellular decatenase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**: 8653-8660.
- Ogawa T. and Okazaki, T. (1984) Function of RNase H in DNA replication revealed by RNase H defective mutants of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **193**:231-237.
- Phoenix, P., Raymond, M.A., Massé, E. and Drolet, M (1997) Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation *in vitro*. *J Biol Chem* **272**: 1473-1479.
- Pruss, G. J. (1985) DNA topoisomerase I mutants. Increased heterogeneity in linking number and other replicon-dependent changes in DNA supercoiling. *J Mol Biol* **185**: 51-63.
- Pruss, G.J., Manes, S.H. and Drlica, K (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell* **31**: 35-42.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.



- Simmons, L.A., Breier, A.M., Cozzarelli, N.R. and Kaguni, J.M. (2004) Hyperinitiation of DNA replication in *Escherichia coli* leads to replication fork collapse and inviability. *Mol Microbiol* **51**: 349-358.
- Steck, T.R. and Drlica, K. (1984) Bacterial chromosome segregation: evidence for DNA gyrase involvement in decatenation. *Cell* **36**: 1081-1088.
- Sternglanz R, DiNardo S, Voelkel K.A., Nishimura Y., Hirota Y., Becherer K., Zumstein L. and Wang J.C. (1981) Mutations in the gene coding for *Escherichia coli* DNA topoisomerase I affect transcription and transposition. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 2747-2751.
- Stupina, V.A. and Wang, J.C. (2005) Viability of *Escherichia coli topA* mutants lacking DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* **280**: 355-360.
- Travers, A. and Muskhelishvili, G. (2005a) Bacterial chromatin. *Curr Opin Genet Dev* **15**: 507-514.
- Travers, A. and Muskhelishvili, G. (2005b) DNA supercoiling - a global transcriptional regulator for enterobacterial growth? *Nat Rev Microbiol* **2**: 157-169.
- Westerhoff H.V., O'Dea M.H., Maxwell A. and Gellert, M. (1988) DNA supercoiling by DNA gyrase. A static head analysis. *Cell Biophys.* **12**: 157-181.
- Zahradka, D., Vlahovic, K., Petranovic, M. and Petranovic, D. (1999) Chromosome segregation and cell division defects in *recBC sbcBC ruvC* mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 6179-6183.
- Zechiedrich E.L. and Cozzarelli N.R. (1995) Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **9**: 2859-2869.
- Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B. and Cozzarelli, N.R. (1997) Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **11**: 2580-2592.
- Zechiedrich EL, K.A., Bachellier S, Schneider R, Chen D, Lilley DM and Cozzarelli NR (2000) Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**: 8103-8113.
- Zhu, Q., Pongpech, P., and DiGate, R.J. (2001) Type I topoisomerase activity is required for proper chromosomal segregation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9766-9771.

**Acknowledgements:**

We thank Dr Russell DiGate and Kenneth Mariani for antibodies and Dr Nicholas Cozzarelli for LZ1 strain. We also thank Patrick Hallenbeck for editing of the manuscript. This work was supported by grant FNR 12667 from the CIHR to M.D and NIH grant AI35257 to K.D. M.D. was a Chercheur-Boursier Senior from the FRSQ.

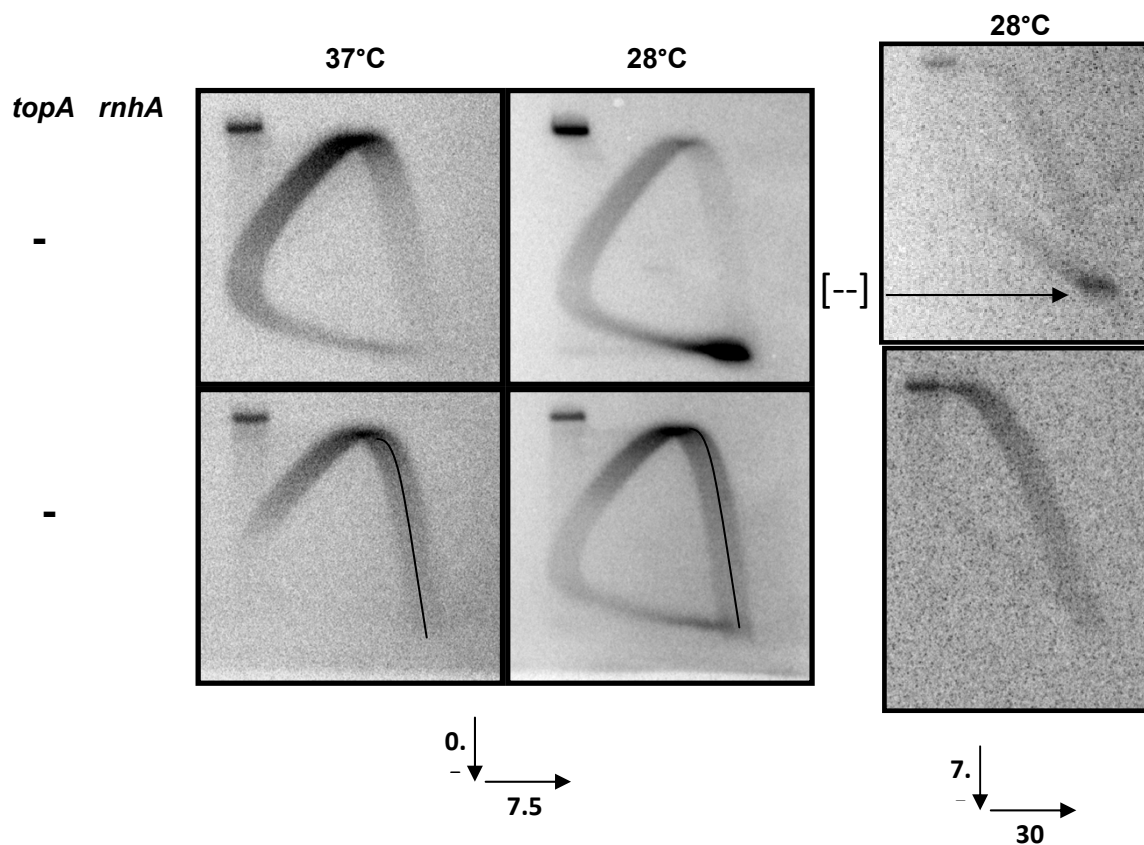
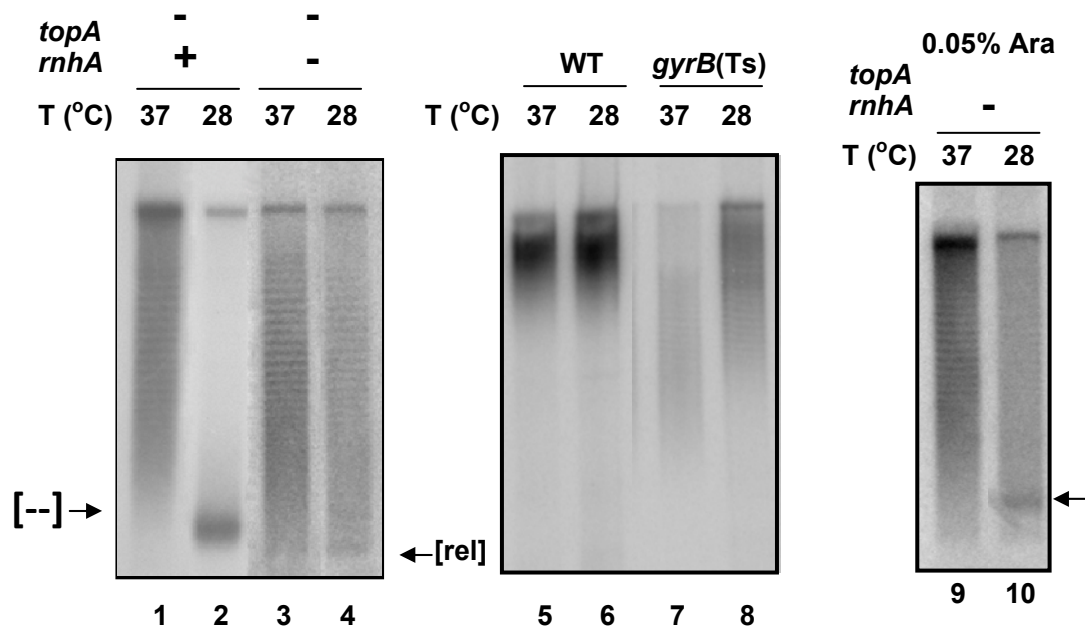
**Table 1.** *Escherichia coli* strains used in this study.

Strain	Genotype	Source or Ref.
AQ634	<i>ilv metB his-29 trpA9605 pro thyA deoB</i> (or <i>C</i> )	Hraiky <i>et al.</i> , 2000
MA249	AQ634 <i>gyrB221</i> (cou <sup>R</sup> ) <i>gyrB203</i> (Ts) <i>zie-3163::Tn10kan</i>	Hraiky <i>et al.</i> , 2000
MA251	MA249 <i>gyrB221</i> (cou <sup>R</sup> ) <i>gyrB203</i> (Ts) <i>zie-3163::Tn10kan topA20::Tn10</i>	Hraiky <i>et al.</i> , 2000
CM23	MA251 pBAD18 <i>rnhA</i>	This work
RFM430	<i>rpsL, galK2, ΔtrpE</i>	Drolet <i>et al.</i> , 1995
MIC1020	AB1157 <i>rnhA::cam</i>	Itaya and Crouch, 1991
PH379	RFM430 <i>rnhA::cam</i>	This work
PS147	CM23 <i>rnhA::cam</i>	This work
PS151	PS147 pGB2 <i>nusB::kan</i>	This work
PS152	MA251 pGB2 <i>nusB::kan</i>	This work
RM445	<i>rpsL galK2 gyrB221</i> (cou <sup>R</sup> ) <i>gyrB203</i> (Ts) <i>Δlac74</i>	Drolet <i>et al.</i> , 1995
RFM475	<i>rpsL galK2 gyrB221</i> (cou <sup>R</sup> ) <i>gyrB203</i> (Ts) <i>Δ(topA cysB)204 Δlac74</i>	Drolet <i>et al.</i> , 1995
SB224	RFM475 pPH1243	This work
SB383	SB224 <i>rnhA::cam</i>	This work
LZ1	Hfr <i>thi gyrA</i> <sup>L83</sup> <i>zei-723::Tn10</i>	Zechiedrich <i>et al.</i> , 2000
PS158	RFM475 <i>gyrA</i> <sup>L83</sup> <i>zei-723::Tn10</i>	This work
VU21	PS158 pPH1243	This work
PS160	SB383 <i>gyrA</i> <sup>L83</sup> <i>zei-723::Tn10</i>	This work

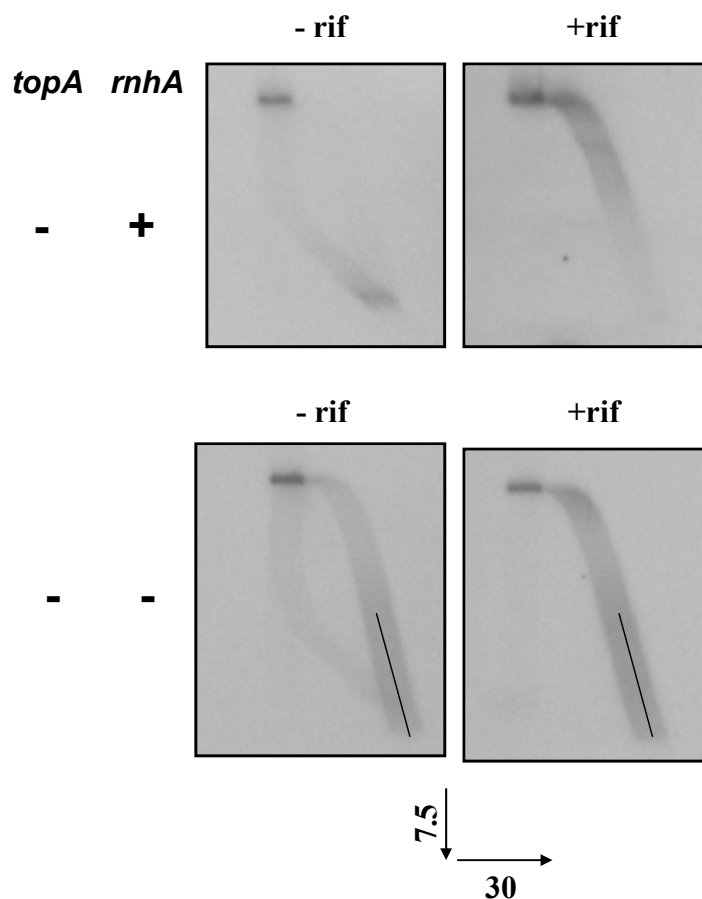
---

VU48	MG1655 <i>sbmC::kan</i>	Carmen Gomez- Eichelmann
VU56	RFM475 <i>sbmC::kan</i>	This work
VU64	VU56 pPH1243	This work
VU70	VU64 <i>rnhA::cam</i>	This work

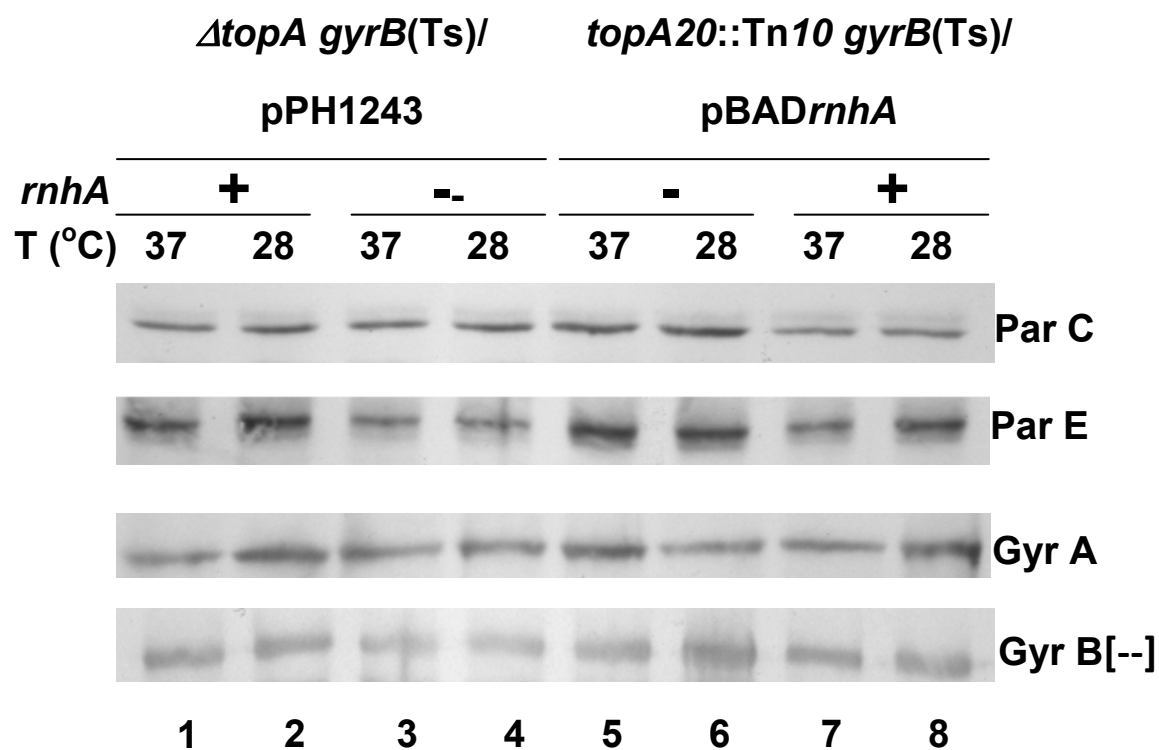
---



**Figure 1. Supercoiling in a *topA rnhA* null double mutant.** AQ634 (wild-type), MA249 (*gyrB*(Ts), PS152 (*topA*<sup>-</sup>, *rnhA*<sup>+</sup>/pGB2nusB::kan) and PS151 (*topA*<sup>-</sup>, *rnhA*<sup>-</sup>/pGB2nusB::kan and pBAD18*rnhA*) cells were grown overnight at 37<sup>0</sup>C in the absence of arabinose. Overnight cultures were diluted 1:1000 in LB medium with or without arabinose (0.05%) as indicated and grown at 37<sup>0</sup>C. DNA was extracted just before the temperature downshift and 60 minutes after the downshift (28<sup>0</sup>C). DNA samples were loaded on agarose gels for 1-D (with 7.5 µg/ml of chloroquine in (A) or 2-D (chloroquine concentrations in µg/ml are indicated by arrows in (B) electrophoresis. The gels were hybridized with a probe to detect pGB2nusB::kan. [--] points to hypernegatively supercoiled DNA. [rel] indicates extensively relaxed DNA. In (B), lines were traced over the more relaxed topoisomers.

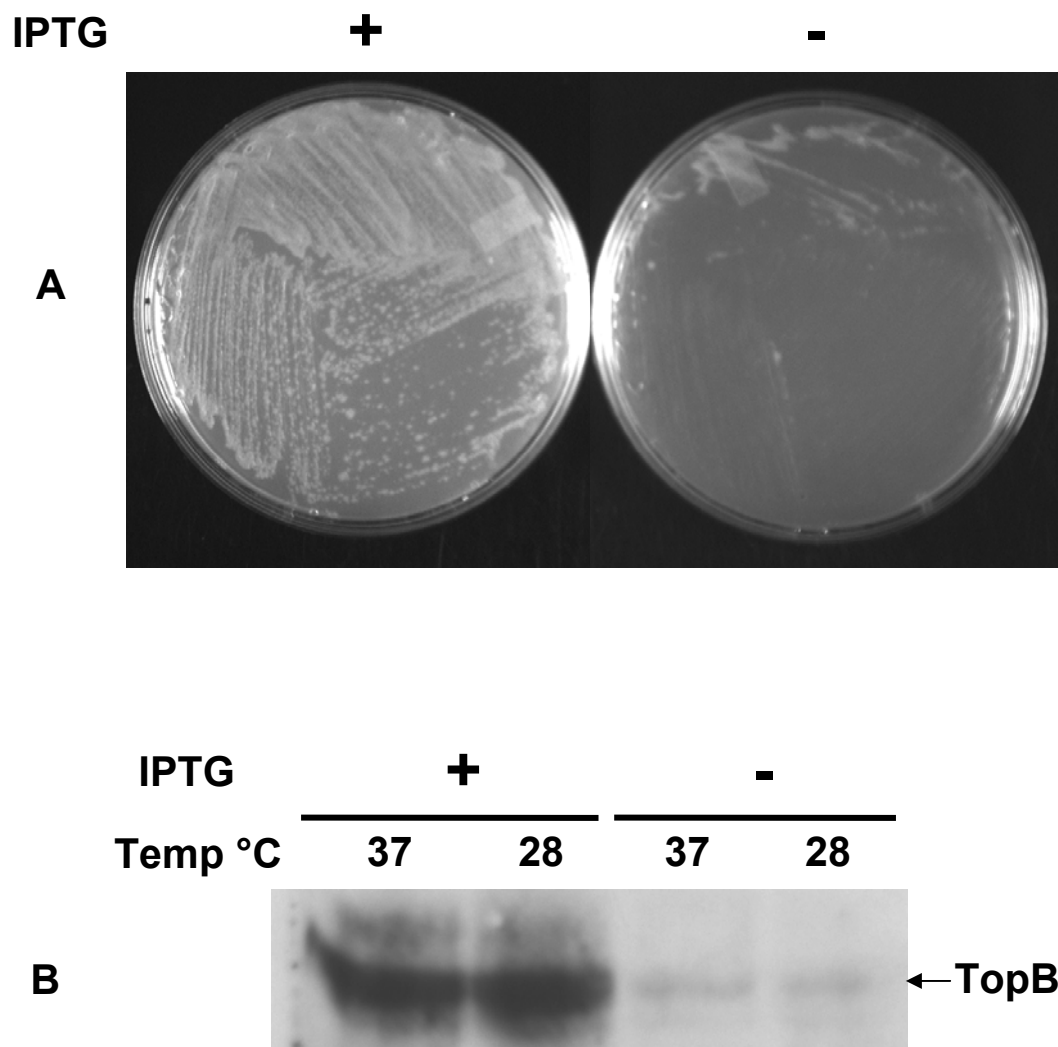


**Figure 2. Supercoiling in a *topA rnhA* null double mutant after transcription inhibition.** PS152 (*topA*<sup>-</sup>, *rnhA*<sup>+</sup>/ pGB2nusB::kan) and PS151 (*topA*<sup>-</sup>, *rnhA*<sup>-</sup>/ pGB2nusB::kan and pBAD18*rnhA*) cells were grown at 37°C in the absence of arabinose as indicated in the legend to Fig. 1. Rifampicin (250 µg/ml) was added or not as indicated, 15 minutes before the temperature downshift and the DNA was extracted 60 min after the downshift (28°C). DNA samples were loaded on an agarose gel for 2-D electrophoresis (chloroquine concentrations in µg/ml are indicated by arrows). The gel was hybridized with a probe to detect pGB2nusB::kan. Lines were traced over the more relaxed topoisomers (bottom panels).

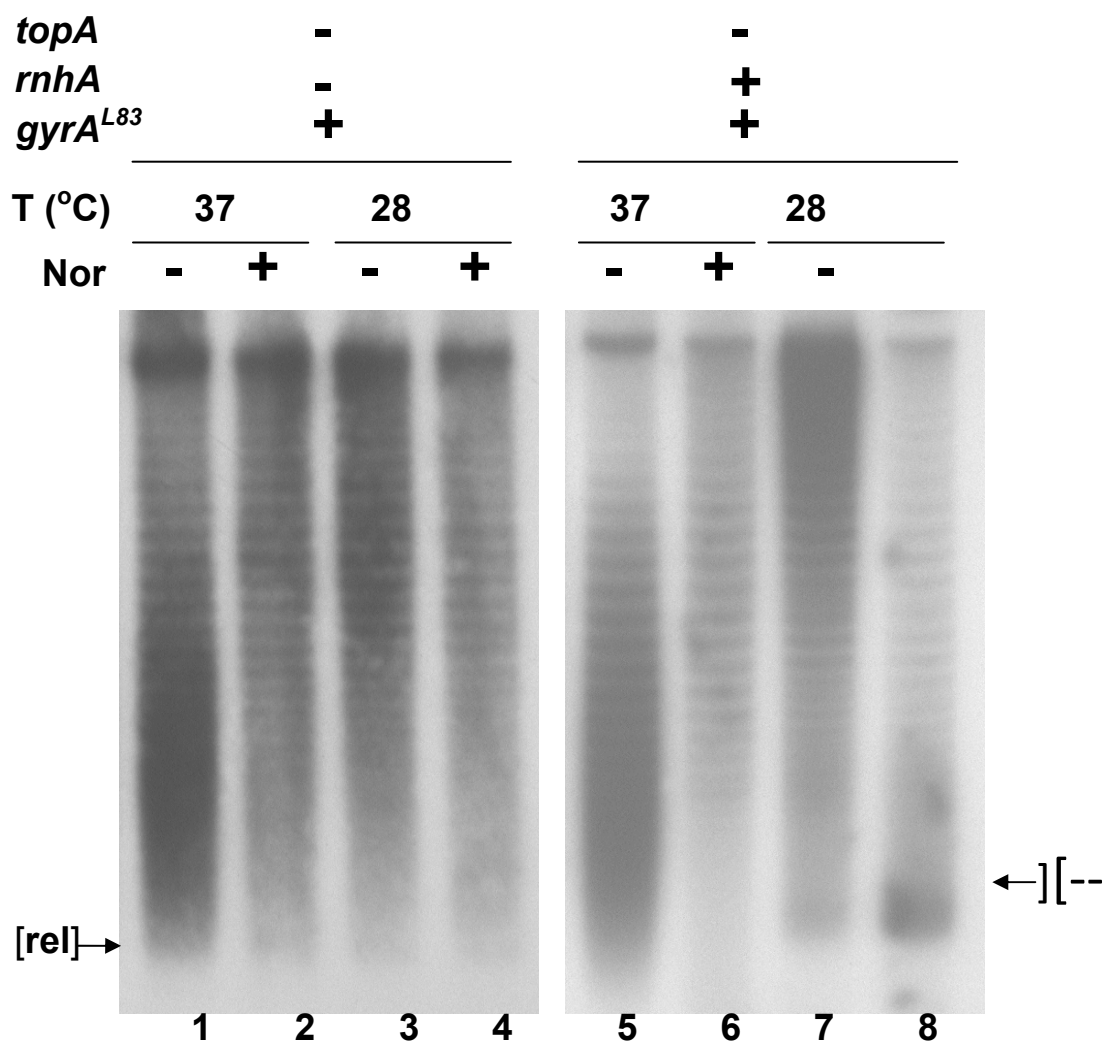


**Figure 3. Western blot analysis to measure topoisomerase IV and gyrase levels in *topA rnhA* mutants.** RFM475 (*gyrB(Ts) ΔtopA*), SB383 (*gyrB(Ts) ΔtopA rnhA::cam/pPH1243*), PS147 (*gyrB(Ts) topA20::Tn10 rnhA::cam/pBAD18*rnhA**) and MA251 (*gyrB(Ts) topA20::Tn10*) cells were grown at 37°C in LB medium (no IPTG, no arabinose). Aliquots of cells were used for western blots as described in Experimental procedures. Lanes 1, 3, 5 and 7, aliquots of cells grown at 37°C; lanes 2, 4, 6 and 8, aliquots of cells exposed to 28°C for one hour.

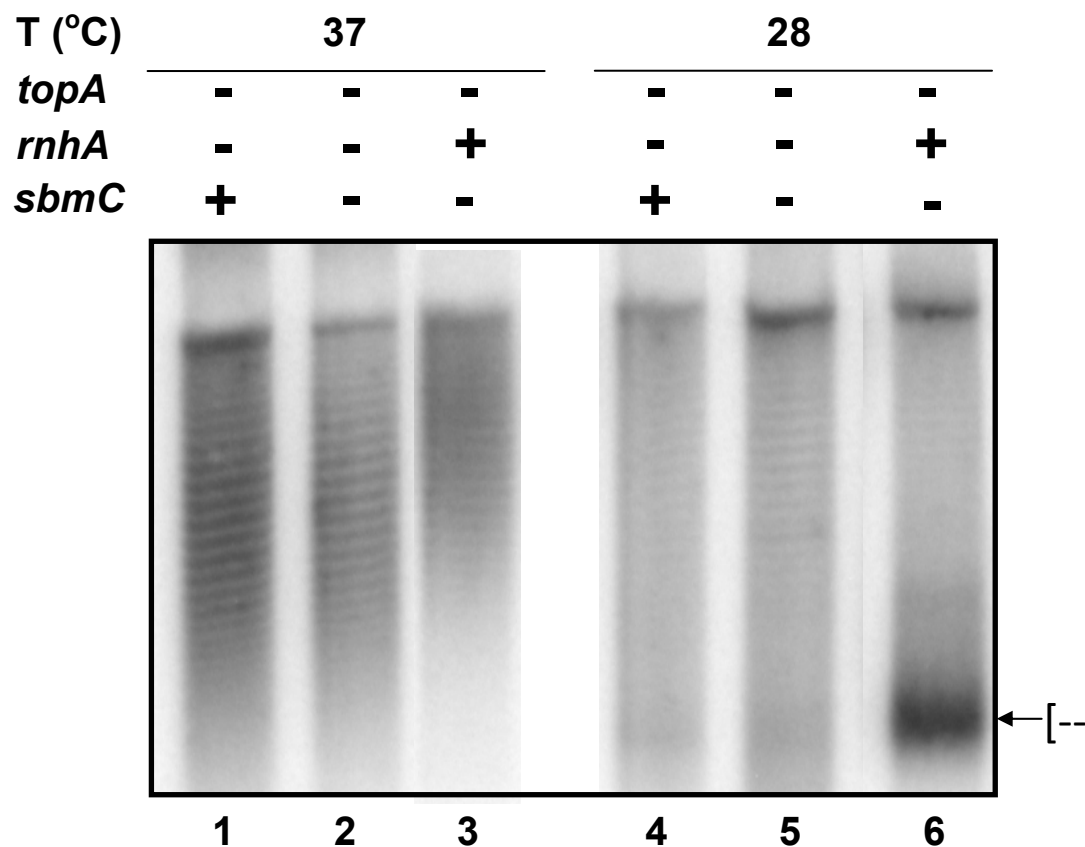




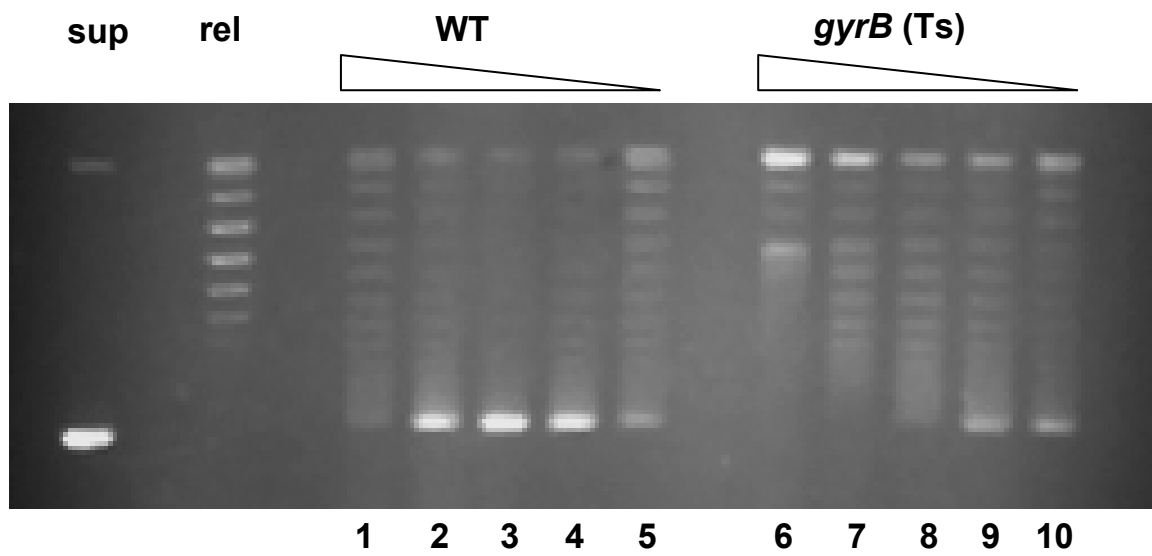
**Figure 4. Complementation of a *topA rnhA* mutant by topoisomerase III overproduction.** In (A) SB383 (*gyrB*(Ts)  $\Delta$ *topA rnhA::cam*/pPH1243) cells were streaked on solid LB medium with 1 mM or no IPTG as indicated. The plates were incubated overnight at 37°C. In (B) SB383 cells were grown in LB at 37°C with or without 1 mM IPTG as indicated and aliquots were used for western blots with anti-topoisomerase III antibodies. Aliquots were also obtained from cells 60 min after a temperature downshift to 28°C.



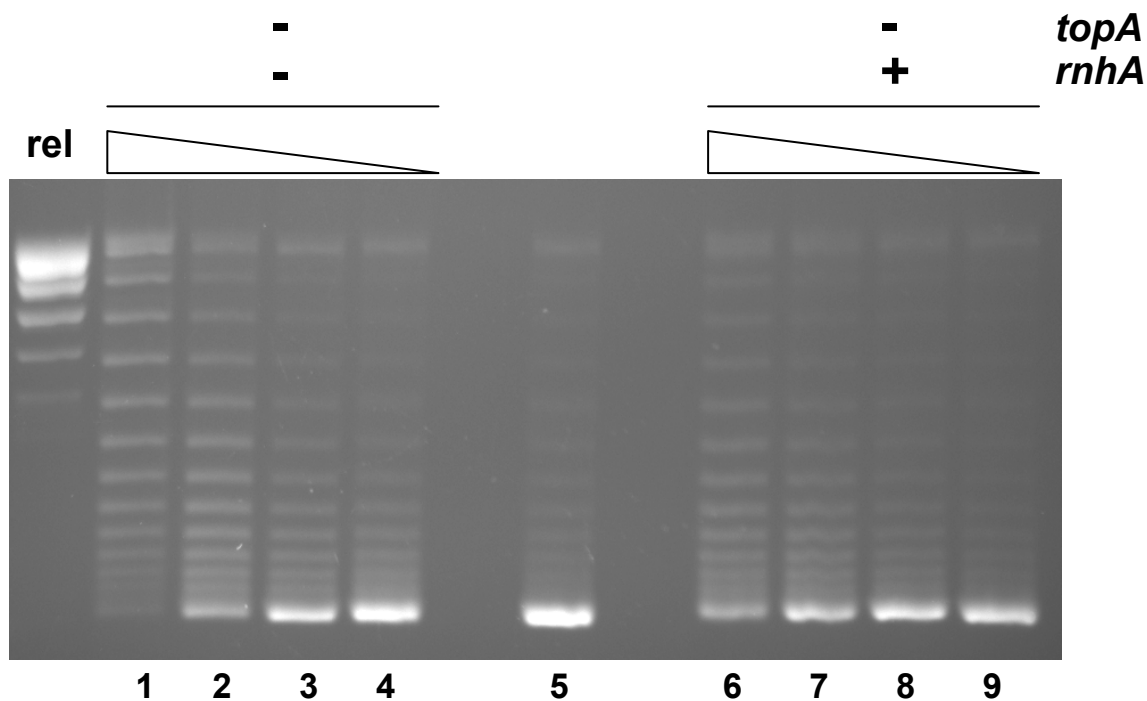
**Figure 5. Topoisomerase IV inhibition does not promote hypernegative supercoiling in a double *topA rnhA* mutant.** PS160 (*topA*<sup>-</sup>, *rnhA*<sup>-</sup> *gyrA*<sup>L83</sup>/pPH1243) and VU21 (*topA*<sup>-</sup>, *rnhA*<sup>+</sup> *gyrA*<sup>L83</sup>/pPH1243) cells were grown at 37°C in LB without IPTG to log phase and norfloxacin (60 μM final) was added or not as indicated. Aliquots of cells were taken for DNA extraction 30 min later and the remaining cells were transferred to 28°C. 30 min later aliquots of cells were taken for DNA extraction. DNA was analyzed in an agarose gel with 7.5 μg/ml chloroquine. The gel was hybridized with a probe to detect pPH1243 topoisomers. [---] point to hypernegatively supercoiled DNA. [rel] indicates extensively relaxed DNA.



**Figure 6. GyrI, a gyrase inhibitor, plays no role in supercoiling inhibition in a *topA rnhA* null double mutant.** SB383 (*topA*<sup>-</sup>, *rnhA*<sup>-</sup>, *sbmC*<sup>+</sup>/pPH1243), VU70 (*topA*<sup>-</sup>, *rnhA*<sup>-</sup>, *sbmC*/pPH1243) and VU64 (*topA*<sup>-</sup>, *rnhA*<sup>+</sup>, *sbmC*/pPH1243) cells were grown at 37°C in the presence of 1 mM IPTG. Spectinomycin was added to 400 µg/ml 15 min before the temperature downshift to 28 °C. DNA was extracted 60 min after the downshift and samples were loaded on an agarose gel (with 7.5 µg/ml of chloroquine) for 1-D electrophoresis. The gel was hybridized with a probe to detect pPH1243 topoisomers. [-] point to hypernegatively supercoiled DNA.

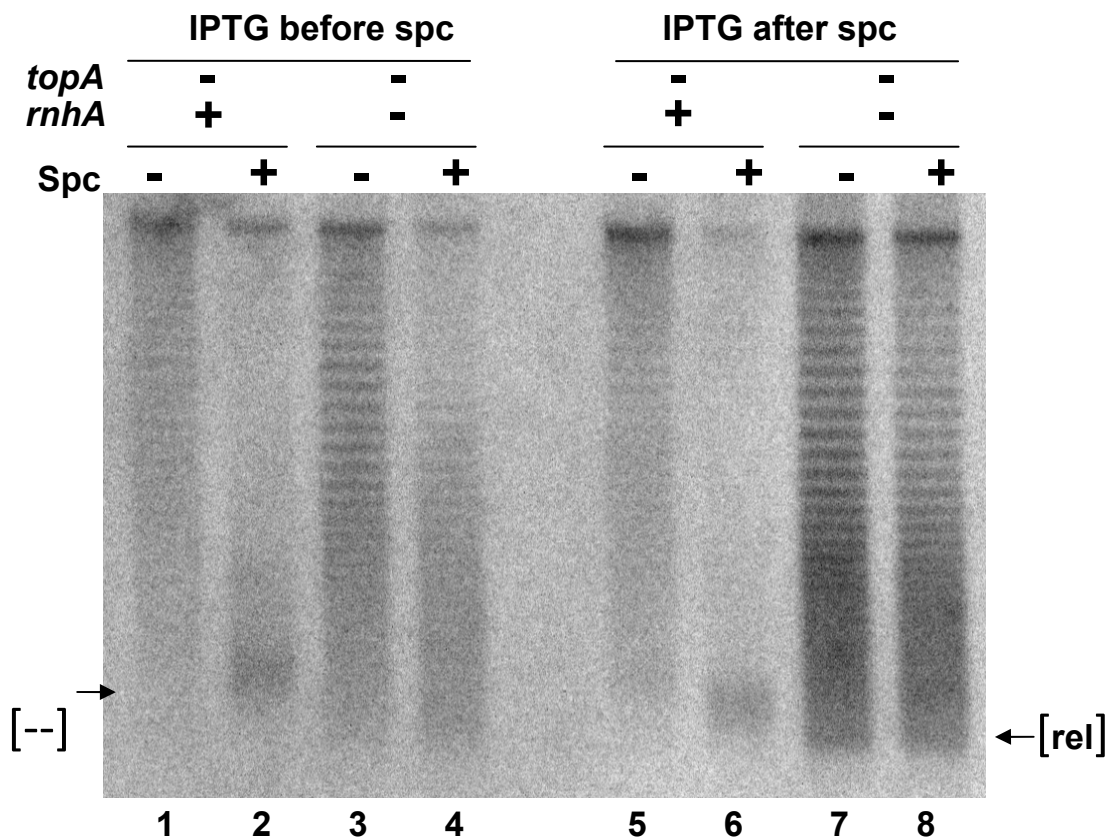






**Figure 7. Supercoiling assays in crude cell extracts.** Crude cell extracts were prepared and used for supercoiling assays as described in Experimental procedures. In (a), the amounts of protein used in the assays were 28  $\mu\text{g}$  (lanes 1 and 6), 14  $\mu\text{g}$  (lanes 2 and 7), 7  $\mu\text{g}$  (lanes 3 and 8), 3.5  $\mu\text{g}$  (lanes 4 and 9) and 1.75  $\mu\text{g}$  (lanes 5 and 10). The reactions were incubated at 30°C for 2 hours. sup is supercoiled pBR322 and rel is relaxed pBR322. WT and *gyrB*(Ts) respectively indicate AQ634 and MA249 strains that were used in the experiment. In (b), the amounts of protein used in the assays were 40  $\mu\text{g}$  (lanes 1 and 7), 20  $\mu\text{g}$  (lanes 2 and 8), 10  $\mu\text{g}$  (lanes 3 and 9), 5  $\mu\text{g}$  (lanes 4 and 10), 2.5  $\mu\text{g}$  (lanes 5 and 11) and 1.25  $\mu\text{g}$  (lanes 6 and 12). The reactions were incubated at 30°C for 4 hours with twice the amount of ATP. At the top of the ethidium bromide stained gel (top panel), sup is supercoiled pBR322 and rel is relaxed pBR322. The bottom panel is a picture of the gel probed with a random prime-labelled fragment hybridizing to the *bla* gene of pBR322. The strains used in the experiment were PS151 (*topA*<sup>-</sup>, *rnhA*<sup>-</sup>/ pGB2nusB::kan and pBAD18*rnhA*) and PS152 (*topA*<sup>-</sup>, *rnhA*<sup>+</sup>/ pGB2nusB::kan). They were grown in the absence of arabinose and the log phase cultures were obtained from the overnight ones diluted 1:1000. In

(c), 2.5  $\mu\text{g}$  of proteins from a crude cell extract of the wild-type strain (AQ634) were mixed with 0, (lane 5), 5 (lane 1), 2.5 (lane 2), 1.25 (lane 3) or 0.63  $\mu\text{g}$  (lane 4) of proteins from the crude extract of PS151 strain used in (b) and with 5 (lane 6), 2.5 (lane 7), 1.25 (lane 8) and 0.63  $\mu\text{g}$  (lane 9) of proteins from the crude extract of PS152 strain used in (b). The reactions were incubated at 30<sup>0</sup>C for 2 hours. sup is supercoiled pBR322 and rel is relaxed pBR322.



**Figure 8. Topoisomerase III overproduction does not change supercoiling in a *topA rnhA* null double mutant.** SB224 (*topA*<sup>-</sup>, *rnhA*<sup>+</sup>/pPH1243) and SB383 (*topA*<sup>-</sup>, *rnhA*<sup>-</sup>/pPH1243) cells were grown in LB to log phase at 37°C. Spectinomycin was added to 400 µg/ml 15 min before the temperature downshift to 28°C. IPTG before spc means that IPTG was added to 1 mM during the growth at 37 °C whereas IPTG after spc means that IPTG was added to 1 mM 5 min after the temperature downshift. DNA was extracted 60 min after the downshift and used for 1-D (7.5 µg/ml chloroquine) gel analysis. The gel was hybridized with a probe to detect pPH1243. [--] points to hypernegatively supercoiled DNA. [rel] indicates extensively relaxed DNA.



Fig 9a

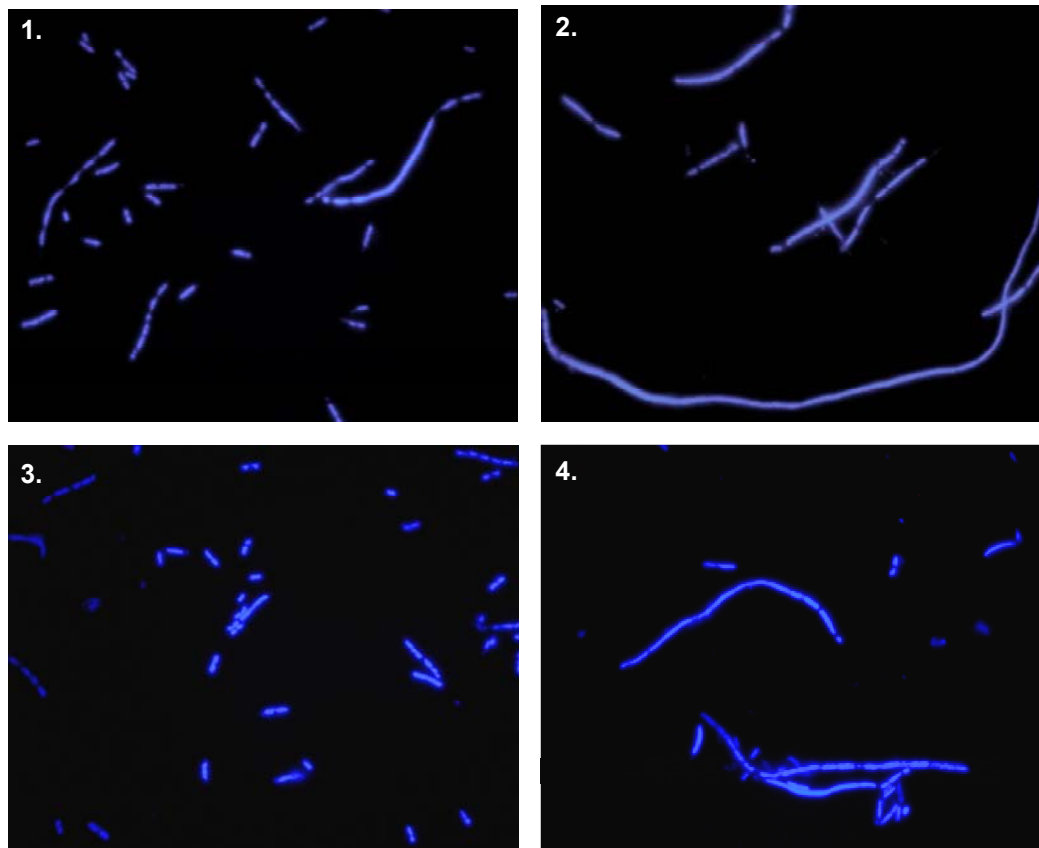


Fig 9b

*topA rnhA* null mutant/pPH1243

- IPTG

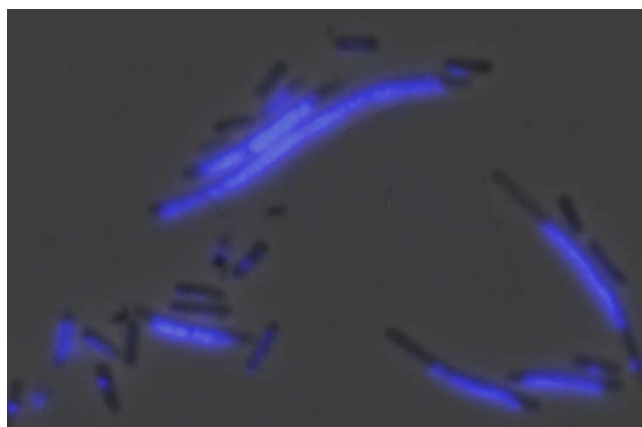
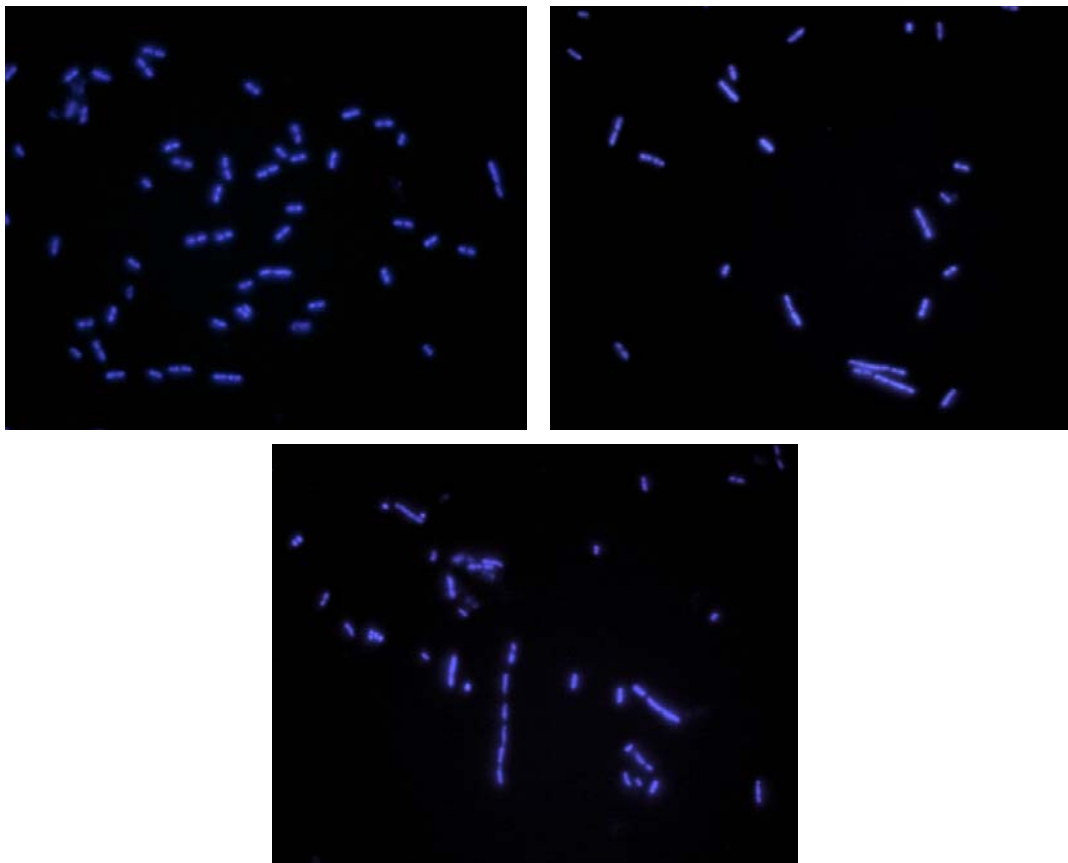


Fig 9c



**Figure 9. DAPI staining of *topA rnhA* null mutants reveals segregation defects that are corrected by topoisomerase III overproduction.** Cells were grown and prepared for microscopy as described in Experimental procedures. In a), 1 and 2 are fluorescence pictures of DAPI stained SB383 cells (*gyrB*(Ts)  $\Delta$ *topA rnhA::cam*/pPH1243) respectively grown in the presence and the absence of IPTG both during overnight growth on plates and during growth in liquid. 3 and 4 are fluorescence pictures of DAPI stained PS151 cells (*gyrB*(Ts) *topA20::Tn10 rnhA::cam*/pBAD18*rnhA*) respectively grown in the presence and the absence of arabinose both during overnight growth on plates and during growth in liquid. Superimposed pictures of phase contrast and fluorescence (by using Adobe Photoshop) of DAPI stained SB383 (no IPTG) cells are shown in b). Yellow and green arrows indicate respectively anucleate cells and cells with low DNA content. In c), 1 to 3 are fluorescence pictures of DAPI stained RFM430 (wild-type), PH379 (*rnhA::cam*) and RFM475 (*gyrB*(Ts)  $\Delta$ *topA*) cells, respectively.

