

Université de Montréal

Le système de recombinaison site-spécifique
dif/Xer de *Campylobacter jejuni*

par

Zoulikha Rezoug

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de Médecine

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

Décembre, 2011

©Zoulikha Rezoug, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Le système de recombinaison site-spécifique *dif/Xer* de *Campylobacter jejuni*

Présenté par :

Zoulikha Rezoug

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr France Daigle,
présidente-rapporteuse

Dr George Szatmari,
directeur de recherche

Dr Philippe Fravallo,
membre du jury

Résumé

Chez les bactéries à chromosome circulaire, la réplication peut engendrer des dimères que le système de recombinaison site-spécifique *dif*Xer résout en monomères afin que la ségrégation des chromosomes fils et la division cellulaire se fassent normalement. Ses composants sont une ou deux tyrosines recombinases de type Xer qui agissent à un site de recombinaison spécifique, *dif*, avec l'aide de la translocase FtsK qui mobilise l'ADN au septum avant la recombinaison. Ce système a été d'abord identifié et largement caractérisé chez *Escherichia coli* mais il a également été caractérisé chez de nombreuses bactéries à Gram négatif et positif avec des variantes telles que les systèmes à une seule recombinase comme *dif_{SL}*/XerS chez *Streptococcus* sp et *Lactococcus* sp. Des études bio-informatiques ont suggéré l'existence d'autres systèmes à une seule recombinase chez un sous-groupe d' ϵ -protéobactéries pathogènes, dont *Campylobacter jejuni* et *Helicobacter pylori*. Les acteurs de ce nouveau système sont XerH et *dif_H*. Dans ce mémoire, les premières recherches *in vitro* sur ce système sont présentées. La caractérisation de la recombinase XerH de *C. jejuni* a été entamée à l'aide du séquençage de son gène et de tests de liaison et de clivage de l'ADN. Ces études ont montré que XerH pouvait se lier au site *dif_{SL}* de *S. suis* de manière non-coopérative : que XerH peut se lier à des demi-sites de *dif_{SL}* mais qu'elle ne pouvait, dans les conditions de l'étude effectuer de clivage sur *dif_{SL}*. Des recherches *in silico* ont aussi permis de faire des prédictions sur FtsK de *C. jejuni*.

Mots-clés : Recombinaison site-spécifique/ tyrosine recombinase/ XerH/ *dif_H*/
Campylobacter jejuni

Abstract

DNA replication can form dimers in bacteria harboring a circular chromosome. The *dif*/Xer recombination system resolves monomers them so that chromosome segregation and cell division take place normally. This system is composed of one or two tyrosine recombinases that act at a specific recombination site, *dif*, with the help of the FtsK translocase that mobilises DNA to the septum before recombination. The Xer system has been first identified and widely characterized in *Escherichia coli* where XerC and XerD are the recombinases. The system has been found and studied in many other Gram negative and positive bacteria. A different form, carrying a single recombinase acting on an atypical site, has been identified in Streptococci and Lactococci, *dif_{SL}*/XerS. *In silico* studies suggested the existence of other single recombinase systems in a sub-group of pathogenic ϵ -proteobacteriasuch as *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. The components of this system were identified as XerH and *dif_H*. In this thesis, the first *in vitro* studies made on this system are presented. The characterization of the XerH recombinase of *C. jejuni* started with the sequencing of its gene and with the DNA binding and cleavage assays. These studies showed that XerH could bind *dif_{SL}* of *S. suis* non-cooperatively, that it could bind *dif_{SL}* half-sites and that it was unable to perform cleavage on *dif_{SL}*. Also, *in silico* comparisons permitted predictions on FtsK of *C. jejuni*.

Keywords: Site-specific recombination/ tyrosine recombinase/ XerH/ *dif_H*/
Campylobacter jejuni.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	ix

Chapitre I : INTRODUCTION

1. Recombinaison site-spécifique

1.1 Généralités.....	1
1.2 Les sérines recombinases.....	7
1.3 Les tyrosines recombinases.....	10

2. La recombinaison site-spécifique de type Xer

2.1 Généralités.....	12
2.2 XerC et XerD.....	15
2.2.1 XerC (Généralités et Fonction).....	19
2.2.2 XerD (Généralités et Fonction).....	21
2.2.3 Le mécanisme catalytique de XerC et XerD (Structure et Fonction).....	22
2.3 XerS.....	25
2.4 XerH.....	27
2.5 Le site d'action des recombinases Xer (Généralités).....	28
2.5.1 Le site de recombinaison chromosomique.....	32
2.5.1.1 Le site <i>dif</i> d' <i>Escherichia coli</i>	32

2.5.1.1.1	Structure.....	34
2.5.1.1.2	Lien entre recombinaison, division cellulaire et structure chromosomique.....	36
2.5.1.2	Le site <i>dif_{SL}</i> des streptocoques et lactocoques.....	37
2.5.1.2.1	Structure.....	38
2.5.1.2.2	Le site <i>dif_{SL}</i> versus le site <i>dif_H</i>	39
2.6	Facteurs accessoires.....	40
2.6.1	FtsK.....	41
2.7	Régulation du système de recombinaison <i>dif</i> /Xer.....	45
2.7.1	Contrôle de la recombinaison homologue.....	46
3.	<i>Campylobacter jejuni</i>	48
4.	Projet de Maîtrise	53
 Chapitre II: ARTICLE		55
 Abstract		56
 1. Introduction		57
2. Materials and Methods		61
2.1	Bacterial strains and plasmids.....	61
2.2	Growth conditions and DNA manipulations.....	62
2.3	Polymerase chain reaction (PCR) conditions.....	62
2.4	Protein overexpression.....	64
2.5	DNA-binding assays.....	65
2.6	<i>In silico</i> comparisons.....	66
3. Results and Discussion		67
3.1	Cloning Overexpression and Purification of XerH.....	67
3.2	Analysis of <i>dif_H</i> compared to <i>dif_{SL}</i>	67
3.3	DNA binding activity of XerH to <i>dif_{SL}</i>	68
3.4	Non-cooperative binding.....	70
3.5	Binding of XerH to <i>dif_{SL}</i> half sites.....	70
3.6	Activity of XerH on <i>dif_{SL}</i> suicide substrates.....	72

3.7 Comparison of cjFtsK to ssFtsK.....	73
4. Acknowledgments.....	75
5. References.....	76
6. Figure Legends.....	79
7. Figures.....	81
Chapitre III : DISCUSSION.....	86
Le gène <i>xerH</i> et le site <i>dif_H</i> de <i>Campylobacter jejuni</i>, clonage et position dans le génome.....	86
Expériences de liaison à l'ADN.....	90
Substrats suicide.....	93
Hypothèses sur le mécanisme de cjFtsK.....	94
Le cas particulier de <i>Lactobacillus</i>.....	95
Autres expériences et perspectives et conclusion.....	96
RÉFÉRENCES.....	99
REMERCIEMENTS.....	xi

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

TABLEAU 1 : Alignement de séquences de sites de recombinaison de plasmides et de bactéries.....	31
---	----

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I : INTRODUCTION

FIGURE 1 : Les trois issues possibles de la recombinaison site-spécifique.....	4
FIGURE 2 : Mode d'action des intégrases et des résolvases	6
FIGURE 3 : Mécanisme typique des sérines recombinases.....	9
FIGURE 4 : Recombinaison site-spécifique par une tyrosine recombinase.....	12
FIGURE 5 : Structure cristallisée générale de XerD d' <i>E. coli</i>	24
FIGURE 6 : Modèle représentant le complexe formé par XerC, XerD et l'ADN.	25
FIGURE 7 : Comparaison entre XerS, XerC et XerD.....	26
FIGURE 8 : Positions et orientation des séquences <i>Ter</i> chez <i>E. coli</i>	33
FIGURE 9 : Séquence du site <i>dif</i> d' <i>E. coli</i>	35
FIGURE 10 : Le modèle de « co-location ».....	37
FIGURE 11 : Le site <i>dif_{SL}</i>	39
FIGURE 12: Alignement de <i>dif_H</i> et <i>dif_{SL}</i>	39
FIGURE 13: Schéma de FtsK.....	42
FIGURE 14: Formation de dimères de chromosomes.....	47
FIGURE 15: Numérisation d'un micrographe à électron représentant quelques cellules de <i>Campylobacter jejuni</i>	48
FIGURE 16: Les sources et les conséquences de l'infection par <i>Campylobacter jejuni</i>	49
FIGURE 17: Analyse phylogénétique des recombinases XerC, XerD, XerS et XerH.....	52

CHAPITRE II : ARTICLE

FIGURE 1: Alignment of <i>dif_{SL}</i> and <i>dif_H</i> sites with the consensus sequence.....	81
FIGURE 2: Gel retardation analysis of the binding of cjXerH to the whole <i>ssdif_{SL}</i> site in comparison with ssXerS binding.....	82
FIGURE 3: Gel retardation analysis of the binding of cjXerH to the right half and to the left half of <i>ssdif_{SL}</i> site in comparison with ssXerS binding.....	83
FIGURE 4: Denaturing retardation gel of cjXerH activity on suicide substrates in comparison with ssXerS activity.....	84
FIGURE 5: Alignment of the amino acid sequence of cjFtsK and ssFtsK.....	85

CHAPITRE III: DISCUSSION

FIGURE 18 : Gel SDS-PAGE 15% de purification de XerH.....	87
FIGURE 19 : Contexte local et unité transcriptionnelle de XerH dans <i>C. jejuni</i> NCTC 11168.....	87
FIGURE 20 : Alignement des protéines XerH de <i>C. jejuni</i> et XerS de <i>S. suis</i>	89
FIGURE 21 : Site de recombinaison <i>dif_{SL}</i> double brin avec les répétitions inversées surlignées.....	92
FIGURE 22 : Alignement des gènes de FtsK chez les bactéries ayant un système Xer à une seule recombinase.....	95

Liste des abréviations

ACIDES AMINÉS

D: acide aspartique
E: acide glutamique
A: alanine
R: arginine
N : asparagine
C: cystéine
Q: glutamine
G: glycine
H: histidine
I: isoleucine
L: leucine
K: lysine
M: méthionine
F: phénylalanine
P: proline
S: sérine
T: thréonine
W: tryptophane
Y : tyrosine
V: valine

UNITÉS DE MESURE

Å: angstrom
cm: centimètre
Da: Dalton
°C: degré Celsius
g: gramme
h: heure
kb: kilobase
kDa: kiloDalton
µg: microgramme
µl: microlitre
µM: micromolaire
ml : millilitre
mM : millimolaire
min: minute
ng: nanogramme
pb: paire de bases
s: seconde
v/cm: volt par centimètre

Autres

3'PO ₄ : extrémité trois' phosphate	FITC : isothiocyanate de fluorescéine
3'OH: extrémité trois' hydroxyle	IPTG: isopropyl B-D thiogalactopyranoside
5'OH : extrémité cinq' hydroxyle	KOPS: <i>FtsK-orienting polar sequences</i>
aa: acides aminés	LB: Luria-Bertani
ADN: acide désoxyribonucléique	MBP: <i>maltose binding protein</i>
Ap: ampicilline	NaCl: chlorure de sodium
ATP: adénosine triphosphate	NEB: <i>New England Biolabs</i>
ATPase: adénosine triphosphatase	PCR: réaction en chaîne par polymérase
BSA: <i>bovine serum albumin</i>	SDS: sodium dodecyl sulfate
<i>cjXerH</i> : Xer de <i>Campylobacter jejuni</i>	TBE: tampon tris-borate EDTA
C-terminal (e): carboxy-terminale	Ts: thermosensible
DAZ : <i>dif</i> activity zone	UV: ultraviolet
<i>dif_H</i> : site <i>dif</i> de <i>Campylobacter jejuni</i>	XerS : Xer de <i>Streptococcus suis</i>
<i>dif_{SL}</i> : site <i>dif</i> de <i>Streptococcus suis</i>	α: alpha
<i>ecdif</i> : site <i>dif</i> d' <i>Escherichia coli</i>	β: beta
<i>ecXerC</i> : XerC d' <i>Escherichia coli</i>	ε : epsilon
<i>ecXerD</i> : XerD d' <i>Escherichia coli</i>	λ: lambda
EDTA: acide éthylènediaminetétracétique	

Chapitre I

Introduction

1. La recombinaison site-spécifique

1.1. Généralités

La recombinaison génétique est un mécanisme fondamental dans le métabolisme de l'ADN. C'est de cette manière que la diversité génomique est créée et que l'intégrité du génome est assurée (Lesterlin et *al.*, 2004). La recombinaison consiste en une coupure puis un attachement de l'ADN en une nouvelle combinaison. Ce phénomène peut se produire entre deux molécules d'ADN indépendantes ou entre deux segments d'une même molécule. Cette recombinaison peut survenir entre des séquences largement homologues entre elles, on parle alors de recombinaison homologue ; ou bien elle peut survenir entre des séquences spécifiques, relativement courtes et ayant une homologie limitée, c'est alors de la recombinaison site-spécifique.

La recombinaison homologue, dont les principales voies sont RecBCD et RecF, agit souvent comme mécanisme de réparation des bris qui se produisent dans l'ADN mais également comme vecteur de la diversité génétique. RecBCD répare une rupture d'ADN double brin alors que RecF répare une rupture d'ADN simple brin (Dillingham et *al.*, 2008). Lorsque ces systèmes sont mutés, la viabilité des cellules s'en trouve fortement compromise. En outre, lorsque l'enzyme RecBCD a perdu la fonction de chargement de RecA, protéine

importante pour la réparation de l'ADN sans perdre l'activité hélicase, les protéines de la voie RecF peuvent fournir la capacité essentielle de chargement de RecA ce qui répare les bris par une voie «hybride» (Amundsen et *al.*, 2003). En toutes circonstances, la recombinaison homologue survient entre des sites non spécifiques.

La recombinaison site-spécifique, quant à elle, se divise en une succession d'étapes relativement simples qui impliquent au minimum deux acteurs : une recombinase et une paire des sites de recombinaison. Tous les systèmes découverts ou soupçonnés jusqu'à présent possèdent ces deux composants au minimum (Grindley et *al.*, 2006 ; Carnoy et Roten, 2009 ; Cortez et *al.*, 2010 ; Duggin et *al.*, 2011). D'abord, la recombinase se lie aux deux sites de recombinaison. Ensuite, ces complexes recombinase-ADN s'apparient entre eux pour former un complexe synaptique ayant des sites de «*crossover*» juxtaposés. C'est alors que la recombinase catalyse le clivage, l'échange de brin et le ré-attachement de l'ADN au sein du complexe synaptique. Enfin, la synapse se défait et les produits recombinés sont libérés. En fait, l'événement d'échange de brin se produit entre des segments qui n'ont qu'une homologie de séquence limitée (Landy, 1989 ; Kolb, 2002 et Coates et *al.*, 2005). De plus, ces sites sont deux motifs typiquement longs de 30 à 200 nucléotides qui présentent un patron de symétrie partielle de répétitions inversées (*partial inverted-repeat symmetry*). C'est à ce type de séquence que la recombinase se lie. Ce sont également ces motifs qui flanquent une séquence centrale de «*crossover*» où aura lieu la recombinaison. Les paires de sites de recombinaisons sont généralement

identiques mais on connaît des exceptions (*attP* et *attB* de l'intégrase lambda par exemple) (Landy, 1989).

Dans la réaction de recombinaison site-spécifique, les recombinases effectuent des réarrangements de segments d'ADN en reconnaissant et en se liant à de courtes séquences (les sites de recombinaison) auxquelles elles procèdent d'abord au clivage du «squelette» de l'ADN (*backbone*) ; ensuite elles échangent les deux hélices d'ADN ainsi obtenues pour enfin rejoindre les brins d'ADN ensemble. Ce complexe synaptique est alors défait en laissant les produits recombinés. Ces étapes se succèdent avec une conservation du lien phosphodiester et ne requièrent ni synthèse de nouvel ADN ni cofacteur de haute énergie (Grindley et *al.*, 2006). Pour arriver à ce résultat, le mécanisme utilisé est analogue à celui d'une topoisomérase en ce sens où les brins d'ADN sont brisés non pas par hydrolyse mais bien par un transfert de phosphoryle directement vers la chaîne du côté de la recombinase. Si plusieurs systèmes de recombinaison site-spécifique utilisent sans problème une recombinase seule pour les sites de recombinaison, d'autres systèmes requièrent des sites et des protéines accessoires (le Bourgeois et *al.*, 2007).

L'issue de la réaction de recombinaison varie selon l'emplacement relatif et l'orientation des sites où le clivage et la religation se produisent mais aussi par la spécificité intrinsèque de chaque système site-spécifique. Dépendamment de l'arrangement initial des sites de recombinaison, trois résultats sont possibles pour la recombinaison site-spécifique : l'intégration, l'excision ou l'inversion (Fig. 1).

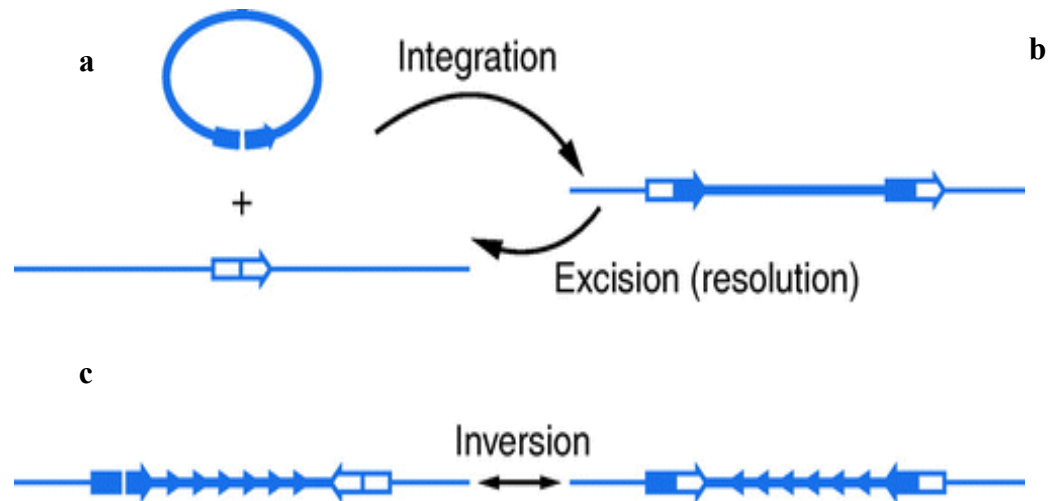


Figure 1. Les trois issues possibles de la recombinaison site-spécifique. Les flèches montrent l'orientation des sites de recombinaison. **a** et **b** montrent les événements d'intégration et d'excision qui réfèrent à une recombinaison où les séquences génétiques sont de taille et/ou de fonction différentes (e. g. chromosome bactérien et génome de phage) tandis que la résolution se produit entre de séquences équivalentes (e. g. deux plasmides). **c** montre une inversion qui se produit entre des sites d'une même molécule. (Grindley et *al.*, 2006; avec permission).

L'intégration se produit par une recombinaison entre des sites provenant de molécules d'ADN séparées (au moins un des sites doit être dans un chromosome circulaire) et ayant une orientation définie. Lorsque les sites sont sur un même chromosome le résultat est déterminé par l'orientation relative. Ainsi, l'excision survient dans le cas d'une recombinaison où les sites sont orientés en tête-à-queue tandis que l'inversion survient lorsque les sites de recombinaison sont orientés en tête-à-tête (inversés).

Que ce soit chez les procaryotes ou les eucaryotes, la plupart des systèmes de recombinaison site-spécifique possèdent des fonctions exclusives, efficaces et rapides. Leur grande spécificité leur a permis d'évoluer de manière à ignorer les

sites ayant une orientation inappropriée pour la recombinaison (Sauer, 1998). La recombinaison site-spécifique est avant tout la réponse à un besoin simple de physiquement joindre ou séparer des segments d'ADN. En plus de l'intégration de phages, de l'excision et de la résolution (décrits plus haut), ce mécanisme est utilisé pour la réduction de dimères de réplication en monomères et pour la transposition d'ADN (Grindley et *al.*, 2006). De plus, les produits de la recombinaison site-spécifique occupent des fonctions biologiques variées telles que la spécificité des voies de développement des bactéries et des bactériophages, l'activation ou la commutation de l'expression de gènes ainsi que la génération de gènes avantageux d'un point de vue évolutif (Grindley et *al.*, 2006).

Malgré la variété de rôles que la recombinaison site-spécifique remplit et les nombreux systèmes identifiés jusqu'à maintenant, la comparaison des séquences d'acides aminés des recombinases indiquent que la vaste majorité d'entre elles se répartissent dans seulement deux catégories, celle des tyrosines recombinases (aussi appelée famille des λ intégrases) (Nunes-Duby et *al.*, 1998) et celle des sérines recombinases (aussi appelée famille des résolvasés d'après la recombinase encodée par des transposons tels que Tn3 et $\gamma\delta$) (Smith et *al.*, 2002). Les deux familles de recombinases ne sont pas reliées, ni en termes de séquence protéique, ni en structure et utilisent des mécanismes de recombinaison différents ce qui laisse croire qu'elles sont apparues et ont évoluées séparément (Grindley et *al.*, 2006). La famille des tyrosines recombinases compte Cre du phage P1, FimB et FimE d'*E. coli*, les protéines XerC et XerD (bactéries) ainsi que la protéine FLP (levures) parmi ses membres les plus connus (Van Duyne, 2001; Guo et *al.*,

1997; Chen *et al.*, 2000 et Sharma *et al.*, 1994) alors que la famille des sérines recombinases est plus hétérogène et inclut des invertases comme Hin et Gin et les résolvases (Smith *et al.*, 2002). Quoiqu'il en soit, aussi bien les tyrosines que les sérines recombinases clivent l'ADN par un déplacement nucléophile de l'hydroxyle d'ADN à l'aide du site actif sur leur chaîne de côté (où se trouve la sérine ou la tyrosine). Celle-ci effectue une réaction de transesterification qui formera l'intermédiaire covalent recombinase-ADN. Les réactions de phosphotransfert en elles-mêmes sont réalisées à travers un déplacement nucléophile d'un groupe hydroxyle par un autre dans un état de transition pentacoordiné (Grindley *et al.*, 2006). Ce sont les détails de ce mécanisme qui diffèrent entre les deux familles comme le montre la figure 2.

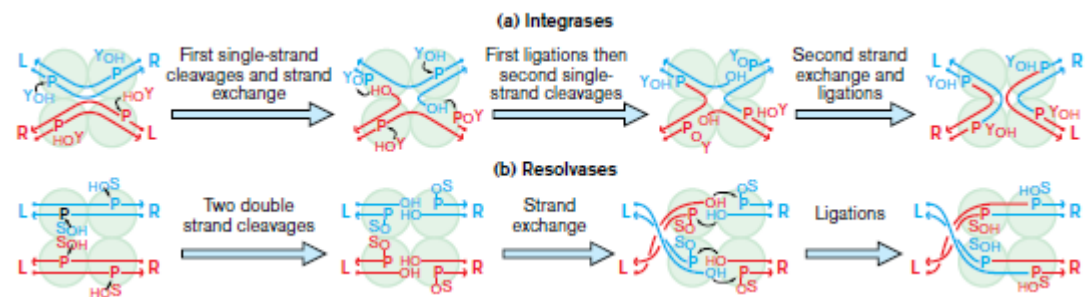


Figure 2. Mode d'action des intégrases et des résolvases. Les lignes représentent les partenaires ADN double brin en bleu et rouge. Les cercles bleus représentent les recombinases en action. **(a)** Mécanisme type des intégrases (tyrosine recombinases). **(b)** Mécanisme type des résolvases (sérine recombinases) (tirée de Grindley 1997 avec permission).

Plus précisément, la figure 2 montre les λ intégrases qui effectuent des paires échanges de simples brins de manière séquentielle et ordonnée entre deux séquences recombinantes partenaires. La première paire d'échanges forme une

jonction de Holliday à quatre voies alors que la deuxième paire d'échanges résout la jonction et complète ainsi la recombinaison. Un résidu tyrosine conservé et utilisé pour le clivage et la formation de l'intermédiaire covalent recombinase-ADN. Les sites de clivage de chaque duplexe d'ADN sont séparés par une séquence centrale de 6 à 8 pb avec un clivage asymétrique en 5' et la tyrosine se joint au phosphate en 3'. En comparaison (figure 2 b), les résolvas $\gamma\delta$ effectuent quant à elles des bris double brins sur les deux séquences à recombinaison puis elles échangent les extrémités et les rejoignent. Le résidu conservé est une sérine qui clive l'ADN à des sites qui sont séparés par seulement 2 pb avec un clivage asymétrique en 3' et elle se joint au phosphate en 5'.

Enfin, il demeure que la recombinaison site-spécifique et la recombinaison homologue sont similaires en termes de précision mais ce qui les distingue est la présence ou l'absence de spécificité de site et de séquence des protéines au moment de la recombinaison.

1.2 Les sérines recombinases

Ce groupe est plutôt hétérogène car les sérines recombinases peuvent être constituées de résidus de 180 à 800 acides aminés (aa) ayant parfois des variations rares en termes d'organisation des domaines. Parmi elles on trouve les invertases Gin du bactériophage Mu et Hin de *Salmonella sp.* et les résolvas TnpR de Tn3/ $\gamma\delta$ et d'autres transposons (Smith et Thorpe, 2002; Grindley et al., 2006). D'ailleurs, ce qu'on sait sur cette famille vient principalement des recherches sur la résolvas $\gamma\delta$. Cette recombinase prototypique a un résidu de 183

aa dont environ 100 constituent le domaine catalytique en N-terminal, lié par une longue hélice α (36 aa) et un segment structuré (10 aa) à un domaine de liaison à l'ADN hélice-tour-hélice typique en C-terminal. Aussi, la sérine nucléophile est près du N-terminus (position 10). Jusqu'à tout récemment, la compréhension mécanistique des sérines recombinases accusait un important retard par rapport à ce qui était connu sur les tyrosines recombinases. En effet, il était bien connu que les sérines recombinases introduisaient des bris double-brins mais la manière dont les extrémités coupées étaient échangées pour former de nouveaux duplexes fut débattue pendant deux décennies. Un modèle suggérait que les deux extrémités d'ADN à rejoindre étaient très proches à l'intérieur d'un complexe protéique relativement statique. L'autre modèle avançait que l'ADN se trouvait à l'extérieur d'un tétramère de protéines et que la recombinaison nécessitait un échange de sous-unités protéiques entières ou à tout le moins des domaines protéiques (Rice, 2005).

Pendant longtemps, les études structurales sur les sérines recombinases sont demeurées difficiles puisque la plupart d'entre elles requièrent des sites de liaison accessoires et sont actives seulement dans le contexte d'un grand complexe de sous-unités formé sur de l'ADN surenroulé (Rice, 2005). Il est maintenant établi, à l'aide d'études de cristallographie, entre autres, que le modèle de rotation des sous-unités est le bon (Li et *al.*, 2005; Rice, 2005). Mais deux questions demeurent : la distance entre les extrémités d'ADN est grande alors comment le clivage se produit-il ? Aussi, comment les sites de liaison accessoires activent la recombinaison?

Les plus récentes études confirment le mécanisme de recombinaison ci-dessous (figure 3). La recombinase se lie au site I puis favorise la recombinaison en introduisant une coupure double-brin dans l'ADN au centre de chaque site. La sérine attaque les sites de recombinaison pour produire cette coupure qui lie de manière covalente les quatre sous-unités recombinases par un lien phosphosérine aux 4 extrémités 5' des brins brisés, ce qui libère les groupements OH en 3' (Reed et Grindley, 1981; Reed et Moser, 1984). Par la suite, les extrémités sont échangées et il y a finalement une religation (Stark et *al.*, 2011).

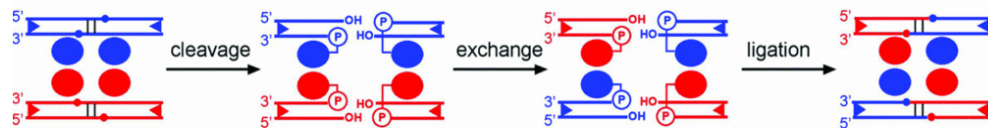


Figure 3. Mécanisme typique de la sérine recombinase. Les lignes doubles en rouge et bleu représentent les deux copies du site I qui prennent part à la recombinaison. Les sous-unités de la recombinase sont dessinées en ovale. On suggère que l'étape d'«échange» se produit par rotation de sous-unité. (Stark et *al.*, 2011 avec permission).

Tel que mentionné plus haut, le modèle favorisé dorénavant est celui de la rotation de sous-unités (Li et *al.*, 2005; Rice, 2005; Stark et *al.*, 1989) et il implique une rotation de 180° d'un côté de l'intermédiaire d'échange de brins par rapport à l'autre côté (étape d'échange dans la figure 3). Les sous-unités protéiques liées au site accessoire ne jouent aucun rôle direct dans la catalyse de l'échange de brins mais elles sont néanmoins essentielles dans les systèmes, tel que démontré par des études de mutations (Rice, 2005).

Ainsi, le clivage des deux brins se fait simultanément avec une libération d'un groupement 3' OH chez les sérines recombinases. C'est dans ces trois

caractéristiques que réside la différence entre cette famille et celle des tyrosines recombinases.

1.2 Les tyrosines recombinases

Cette famille est surtout largement répandue chez les bactéries mais elle est également représentée chez les *Archaea* et même chez les eucaryotes où on a décrit des exemples chez les Fungi, les ciliates et certaines familles de transposons (Nunes-Duby et *al.*, 1998; Poulter et Goodwin, 2005 ; Grindley et *al.*, 2006). Comme le nom l'indique, c'est une tyrosine qui constitue le domaine catalytique de cette famille avec des motifs de séquence reconnaissables car le repliement du domaine entier est bien conservé même lorsqu'il n'y a pas d'identité de séquences en dehors de la région active (Nunes-Duby et *al.*, 1998). À l'exception de FimB et FimE, le domaine catalytique de la recombinase est précédé par un domaine N-terminal variable utile pour lier l'ADN (Grindley et *al.*, 2006). Il est intéressant de noter que ce domaine catalytique est partagé avec au moins deux autres classes d'enzymes comme les topoisomérases de type IB (aident à diminuer la tension du surenroulement sur l'ADN par clivage et religation) et les protéomérases (maintiennent la structure en épingle à cheveux fermée aux extrémités des réplicons de certains procaryotes et virus) (Chaconas et *al.*, 2001 et Deneke et *al.*, 2000).

Parmi les tyrosines recombinases les plus étudiées on trouve λ Int et bien d'autres phage-intégrases, IntI, Cre, XerC/D, FimB FimE et Flp. Ces recombinases remplissent des fonctions d'intégration, d'excision ou d'inversion.

Cette grande famille se subdivise en deux sous-familles que l'on distingue par la direction de leur processus de recombinaison site-spécifique : les phage-intégrases et les recombinases simples de type tyrosine aussi appelées unidirectionnelles (1) ainsi que les tyrosines recombinases bidirectionnelles (2) (Hirano et *al.*, 2011).

La véritable différence mécanistique de ce type de recombinases par rapport à celles de type sérine réside dans l'intermédiaire de recombinaison appelé «Jonction de Holliday» qui résulte de la catalyse de l'échange de brin d'ADN par seules deux molécules sur les quatre du tétramère actif pour le clivage et la religation de l'ADN. Un changement de conformation (isomérisation) interconvertit les paires de sous-unités actives et inactives, et ce, après l'échange de la première paire de brins d'ADN mais avant l'échange de la seconde paire de brins. Plusieurs mécanismes ont été découverts pour expliquer le processus d'isomérisation. Chez Cre, par exemple, un arrangement d'hélices α en C-terminal est permuté cycliquement ce qui permet à plusieurs résidus de sites actifs d'être repositionnés durant l'isomérisation du complexe ADN-protéine conférant ainsi le renversement de l'activité entre les deux paires de sous-unités (Radman-Livaja et *al.*, 2006).

Le mécanisme de recombinaison des tyrosines recombinases est donc séquentiel. D'abord, le groupe hydroxyle du résidu catalytique tyrosine dans les deux recombinases agit comme nucléophile et attaque le brin d'ADN du haut (*top strand*) en cis puis forme un lien phosphotyrosine en 3'. L'extrémité 5' OH libre de chaque brin clivé attaque par la suite le lien 3'phosphotyrosine du complexe

nucléoprotéique opposé et l'échange de brin qui en résulte forme un intermédiaire appelé jonction de Holliday. Après ce premier échange de brin, l'isomérisation de la jonction de Holliday initie le deuxième échange de brin qui est catalysé par l'autre paire de recombinases. Ce second échange de brin résout l'intermédiaire jonction de Holliday et génère le produit de recombinaison (Hirano et *al.*, 2011).

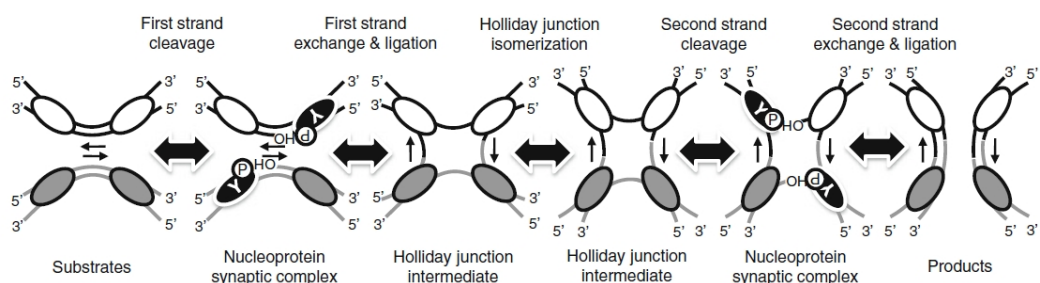


Figure 4. Recombinaison site-spécifique par une tyrosine recombinase. Les ovales blancs et gris représentent les molécules de recombinases qui sont liées à chaque substrat d'ADN. Dans le complexe synaptique nucléoprotéique, les recombinases formant une liaison covalente avec l'ADN sont en ovales noirs et les flèches fines le long des brins du haut «top strands» indiquent le sens du site de recombinaison. Le mécanisme illustré ici est basé sur le mécanisme de la recombinaison médiée par l'intégrase du phage λ et les événements de recombinaison catalysés par d'autres tyrosine recombinases pourraient avoir quelques différences (Hirano et *al.*, 2011 avec permission).

2. La recombinaison site spécifique de type Xer

2.1 Généralités

Dans un microorganisme à chromosome circulaire, les chromosomes nouvellement répliqués doivent être décaténés par des topoisomérases. Or, la séparation de ces chromosomes circulaires fils fait face à un problème additionnel causé par la recombinaison homologe qui, si elle se produit un nombre impair de fois, peut mener les chromosomes fils à être contenus dans la même molécule

dimérique et circulaire. Ce dimère empêche les cellules filles de se diviser car la ségrégation des chromosomes ne se fait pas normalement. Ces dimères de chromosomes tout comme les dimères de plasmides multi-copies sont monomérisés par le système de recombinaison site-spécifique Xer (Summers et Sherratt, 1984; Blakely *et al.*, 1993; Barre *et al.*, 2001 et Aussel *et al.*, 2002). Les gros plasmides «*low copy*» ont leurs propres systèmes de résolution de dimères. Deux tyrosines recombinases apparentées, XerC et XerD se lient à un duplexe de site de recombinaison et produisent une synapse de deux sites pour former un complexe hétérotetramérique de recombinaison (Blakely *et al.*, 1993; Barre *et al.*, 2001). La recombinaison a lieu par deux paires d'échanges de brins séparés dans le temps et l'espace, une paire est médiée par XerC et l'autre l'est par XerD avec, entre les deux événements, un intermédiaire Jonction de Holliday (Sherratt *et al.*, 2004). Du point de vue mécanistique, cette réaction est apparentée à celles médiées par les topoisomérases (Champoux, 2001). C'est chez la bactérie *Escherichia coli* que le système a été le plus largement caractérisé. Le système d'*E. coli* demeure considéré comme la référence et le point de comparaison par rapport aux autres systèmes Xer. Ainsi, la résolution des dimères de chromosomes chez *E. coli* se produit sur un site de recombinaison de 28 pb qu'on appelle *dif* pour (*deletion induced filamentation*) situé au terminus de réplication du chromosome. Ce site tire son nom du phénotype observé lorsqu'il est muté. En effet, une mutation du site de recombinaison ou de l'une ou l'autre des recombinases induit une sous population (10 à 15%) de cellules en filaments, contenant un ADN ségrégué de façon aberrante ou démontrant une induction

partielle du système SOS. Cela est dû à une séparation altérée des chromosomes fils lors de la réplication de l'ADN ce qui provoque un blocage à la fin de la division cellulaire. On sait toutefois que des mutations qui abolissent la recombinaison homologue suppriment ce phénotype. Ceci suggère que la recombinaison Xer «annule» les «dommages» causés par la recombinaison homologue (Blakely et *al.*, 1991; Kuempel et *al.*, 1991; Leslie et Sherratt, 1995; Lesterlin et *al.*, 2004).

Par ailleurs, une réaction de résolution de dimère complète requiert la présence du domaine C-terminal (500 aa) de FtsK, une translocase à 3 domaines qui détient plusieurs rôles dans le cycle cellulaire dont l'initiation de la recombinaison site-spécifique par régulation spatiale (Steiner et *al.*, 1999; Barre et *al.*, 2000 et Aussel et *al.*, 2002). L'issue et les besoins de la réaction de recombinaison diffèrent selon qu'elle se produit chez un plasmide naturel (e. g. *cer* de ColE1) ou chez le chromosome bactérien (*dif* dans *E. coli*) (Arciszewska et Sherratt, 1995). La recombinaison au site *cer* est exclusivement intramoléculaire et, à la différence d'*E. coli*, requiert les protéines accessoires ArgR et PepA ainsi que 190 pb de séquence d'ADN accessoire près du cœur de 30 pb du site de recombinaison qui lie XerC et XerD (Stirling et *al.*, 1988; 1989).

En outre, les progrès effectués ces dernières années en termes de séquençage et d'analyse de génome ont montré que ce système *dif*Xer est présent dans un nombre de plus en plus grand de variantes et ce, chez une panoplie de microorganismes tels que les *Archeae* et les protéobactéries (Grindley et *al.*, 2006 ; Carnoy et Roten, 2009 ; Cortez et *al.*, 2010 ; Duggin et *al.*, 2011). En fait,

dès qu'on est en présence d'espèces à génome circulaire et à activité élevée de recombinaison homologue on peut s'attendre à trouver un système de recombinaison de type Xer mais les limites des techniques de séquençage et de caractérisation ne permettaient pas de vérifier cette hypothèse jusqu'à tout récemment. Ainsi, à partir des bases établies avec le système *dif*Xer d'*E. coli*, on a pu caractériser dernièrement celui d'autres bactéries comme *Haemophilus influenzae* (Neilson et al., 1999), *Pseudomonas aeruginosa* (Blakely et al., 2000), *Bacillus subtilis* (Sciochetti et al., 2001), *Proteus mirabilis* (Villion et Szatmari, 1998 et 2003), *Caulobacter crescentus* (Jouan et Szatmari, 2003), *Streptococcus suis* (Nolivos et al., 2010; et Leroux et Szatmari, 2011) et *Sulfolobus solfataricus* (Duggin et al., 2011). Ces caractérisations récentes ont notamment mis au jour de nouvelles recombinases telles que XerS et de nouveaux sites de recombinaison. En effet, les streptocoques et les lactocoques n'utilisent qu'une seule recombinase pour agir sur un site *dif* non conventionnel (*dif_{SL}*) (Nolivos et al., 2010). Des recherches *in silico* ont aussi permis de trouver des sites *dif* et des Xer présumptifs inconnus jusqu'à ce jour chez des ϵ -protéobactéries pathogènes telles que *Campylobacter sp.* et *Helicobacter sp.* (Carnoy et Roten, 2009).

2.2 XerC et XerD

Les deux tyrosines recombinases dites «classiques» que sont XerC et XerD présentent 37 % d'identité et 59% de similarité et leur capacité à lier le site *dif* est hautement coopérative (Blakely et al., 1993 et 1996). Plus spécifiquement, ces protéines sont des intégrases λ . Ce qui caractérise ce groupe, c'est la présence

d'un motif C-terminal hautement conservé de quatre acides aminés qu'on appelle la tétrade RHRY (Argos et *al.*, 1986; Abremski et *al.*, 1992). Toutes les protéines Xer caractérisées ou séquencées à ce jour contiennent ce motif arginine-histidine-arginine-tyrosine qui attaque le lien phosphodiester à cliver pour générer un complexe de recombinaison hétérotétramérique composé d'une protéine 3'phosphotyrosyle et des extrémités d'ADN 5'hydroxyle (Pargellis et *al.*, 1988). Comme c'est chez *E. coli* que le couple XerC-XerD a été identifié en premier, l'homologie des recombinases d'autres bactéries est toujours mesurée entre elles et par rapport à celles d'*E. coli* (Hayes et *al.*, 1997; Neilson et *al.*, 1999; Recchia et *al.*, 1999 et Sciochetti et *al.*, 1999). Chez *E. coli*, *Caulobacter crescentus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et bien d'autres, XerC et XerD travaillent de manière coopérative et sont toutes deux nécessaires à la recombinaison car XerC agit en premier sur une paire de brins tandis que XerD ne peut être activée et se lier sur l'autre paire que si XerC a clivé l'ADN et que FtsK a mobilisé l'ADN par permutation de l'état catalytique du complexe de recombinaison (Sherratt et *al.*, 2004). De plus, on soupçonne ces recombinases de tenir des rôles dans d'autres processus cellulaires car des mutants Xer montrent parfois des phénotypes inexplicables. On pense notamment à XerD (et non XerC) qui semble essentielle pour la croissance dans *Staphylococcus aureus* (Chalker et *al.*, 2000).

Les recherches sur le plasmide ColE1 ont permis d'identifier pour la première fois XerC car on a remarqué son rôle dans la résolution de multimères en monomères chez ce plasmide (Summers et Sherratt, 1984). XerD, pour sa part, a été découverte plus tard (par Blakely et *al.*, 1993) lorsqu'on a identifié une

protéine putative dans le même opéron que *recJ* et *dsbC* qui présentait homologie de séquence avec XerC (Lovett et Kolodner, 1991; Missiakas et *al.*, 1994). L'action concertée de deux recombinaisons dans le système *diff*/Xer semble garantir l'alignement des sites actifs pour un meilleur contrôle du clivage et de l'échange de brins (Recchia et Sherratt, 1999). XerD a plus d'affinité pour son site de liaison que XerC mais les deux sont mieux liées si l'autre recombinaison est présente (Blakely et *al.*, 1993 et 1997 et Spiers et Sherratt, 1999). Ainsi, la présence des deux partenaires est requise pour la médiation de l'échange de brin sans nécessiter d'activité nucléophile. Autrement dit, une structure tridimensionnelle adéquate au complexe de recombinaison est essentielle pour la liaison des recombinaisons mais celles-ci sont catalytiquement autonomes (Arciszewska et Sherratt, 1995; Arciszewska et *al.*, 1997 et Subramanya et *al.*, 1997). Pour les deux recombinaisons, le domaine C-terminal est mieux conservé que le domaine N-terminal, il contient le résidu catalytique et les régions d'interaction protéine-protéine et de liaison spécifique à l'ADN. Il permet également la mise en place du complexe synaptique et de la tyrosine du motif RHRY (Spiers et Sherratt, 1999). Le domaine N-terminal n'est pas en reste et possède aussi des régions importantes pour l'interaction protéine-protéine. De plus, en s'appuyant sur les analogies observées entre ce domaine et le domaine correspondant chez Cre et FLP, on admet que les hélices α B et D réagissent avec la partie interne du sillon majeur de l'ADN en se liant aux 4 nucléotides du site de liaison de la recombinaison tandis que les domaines de la partie C-terminale se lient

aux 9 pb externes du site cible (Hoess et *al.*, 1990; Panigrahi et *al.*, 1992; Panigrahi et Sadowski, 1994 et Subramanya et *al.*, 1997).

Tel que relaté plus haut, le motif RHRY est le plus important pour l'action des recombinases. Dans XerD et XerC, les deux arginines conservées et la tyrosine sont requises pour le clivage de l'ADN alors que l'histidine conservée est nécessaire à la religation de l'ADN (Blakely et *al.*, 1993; Arciszewska et Sherratt 1995; Arciszewska et *al.*, 1997 et Subramanya et *al.*, 1997). Structurellement parlant, le résidu catalytique est dissimulé dans la protéine lorsqu'elle est inactive (si la recombinase partenaire ou l'ADN sont absents). Il existe un autre acide aminé conservé chez le couple XerD-XerC. Il s'agit d'une lysine (position 172) qui connecte les feuillets antiparallèles $\beta 2$ et $\beta 3$ et qui est présente chez toutes les topoisomérases IB eucaryotes mais aussi chez Cre et HP1. Cette lysine est dans le creux catalytique de XerD et demeure en contact étroit avec le substrat. En fait, les fractions fonctionnelles de la topoisomérase *Vaccinia* qui sont importantes pour la transesterification sont bien conservées chez les intégrases (Cheng et *al.*, 1998 et Cornet et *al.*, 1997). XerD et XerC détendent l'ADN au site *dif* grâce à leur activité topoisomérase mais de manière séparée car si les deux recombinases sont ensemble au site *dif* on observe une inhibition complète de leur activité de relaxation (Cornet et *al.*, 1997). Il est intéressant de noter les nombreuses similitudes fonctionnelles et structurelles entre les topoisomérases IB et les recombinases Xer, à un tel point qu'on soupçonne les deux familles d'avoir une origine commune comme une transférase par exemple (Cheng et *al.*, 1998 et Cao et Hayes, 1999).

2.2.1 XerC

Généralités

Dans la recombinaison site-spécifique, XerC agit en premier en échangeant une paire de brins supérieurs «*Top strands*» pour générer l'intermédiaire Jonction de Holliday (Arciszewska et *al.*, 2000). Le gène qui encode XerC fait partie d'une unité multicistronique où le gène *dapF* (qui a son propre promoteur) est en première position et où *xerC* est en troisième position (Colloms et *al.*, 1990). En position 2 et 4 on retrouve deux ORF : *yigA* et *yigB* dont la fonction est encore incertaine, sauf pour *yigB*, qui semble être une flavine mononucleotide (FMN) phosphatase (Colloms et *al.*, 1990 et Dekkers et *al.*, 1998). Il semble probable que *dapF*, *yigA*, *xerC* et *yigB* soient tous transcrits sur le même ARNm à partir du promoteur de *dapF*. La position de *xerC* sur le chromosome correspond à la 85^{ième} minute, non loin d'*oriC*.

Du point de vue protéique, il est connu que la taille de XerC est de 33,8 kDa chez *E. coli* et qu'elle possède une similarité de séquence d'acides aminés substantielle avec les autres intégrases λ . En effet, les deux domaines les mieux conservés contiennent les résidus catalytiques classiques des intégrases. Le deuxième domaine (38 aa) contient le motif RHRY décrit plus haut et la séquence se rapproche de celle d'une recombinase possible du plasmide R46 (Hall et Vockler, 1987). Dans la région située entre les deux domaines conservés, la séquence de XerC est similaire à la séquence des protéines FimB et FimE encodées chez *E. coli* (Klemm, 1986).

Fonction

Lors de la recombinaison *dif*/Xer, la protéine XerC agit en premier sur le site de recombinaison en se liant à sa partie gauche et en clivant le brin supérieur «*Top strand*» puis en effectuant le premier échange de brin. C'est là que la jonction de Holliday est formée avant d'être résolue par XerD (Arciszewska & Sherratt, 1995). Toutefois, il a été observé que XerC n'agit en premier que durant des activités XerCD autres que la résolution de dimères de chromosomes : durant la résolution de dimères de plasmides sur les sites *psi* ou *cer* et durant l'intégration de génomes de bactériophages vers leur sites *dif* hôtes par exemple (Colloms et al., 1996; Bregu et al., 2002; Aussel et al., 2002; Val et al., 2005 et Nolivos et al., 2010). D'ailleurs, dans ces cas, l'action de XerD n'est parfois même plus nécessaire ou bien elle est induite suite à la formation de la jonction de Holliday. Que ce soit sur un site de recombinaison plasmidique ou chromosomique, la séquence de liaison de XerC est de 11 pb. On a observé qu'un mutant *xerC* affiche (pour 10 à 15% des cellules) un phénotype de nucléoides aberrants et de cellules en filaments car elles montrent une ségrégation chromosomique inefficace. Ce phénotype illustre l'importance du rôle de XerC dans la recombinaison. Son action seule peut effectuer un échange de brins. L'action catalytique de XerD n'est pas nécessaire donc XerC est responsable de l'activation et de l'attaque de l'ADN dans la recombinaison. De plus, on sait que le résidu arginine 148 conservé de XerC influence la structure de la jonction de Holliday et qu'en son absence XerD prend le relais pour le clivage, ce qui inhibe l'action de XerC (Arciszewska & Sherratt, 1995 et Arciszewska et al., 2000). En

résumé, XerC et XerD doivent toutes deux se lier à l'ADN pour que la recombinaison démarre mais XerC peut effectuer l'échange et le clivage seule.

2.2.2 XerD

Généralités

XerD travaille de concert avec XerC lors de la recombinaison site-spécifique comme décrit plus tôt et possède 37% d'identité d'acides aminés avec sa partenaire. Le gène de cette Y-recombinase est situé entre les gènes *xprA* et *recJ* dans la même unité transcriptionnelle et ce, à 63 min sur le chromosome d'*E.coli* (Blakely et al.,1993). En fait, le gène a été découvert lors de la caractérisation de RecJ et a d'abord été appelé *xprB* mais on a vite compris qu'il s'agissait d'une intégrase nouvelle très ressemblante à XerC (Lovett et Kolodner, 1991). Lorsqu'une insertion est effectuée sur *xerD* et qu'il est ainsi muté, on a remarqué que la recombinaison Xer n'avait pas lieu suggérant que le gène est sous le contrôle de son propre promoteur (Blakely et al., 1993). XerD, tout comme XerC, a 298 acides aminés et est composée de deux domaines (I et II) hautement conservés.

Fonction

XerD se lie au demi-site droit et clive le brin du bas «*bottom strand*» sur le site de recombinaison. La liaison se fait de manière hautement coopérative avec XerC et sans cela la recombinaison ne peut avoir lieu efficacement car les recombinases ne s'activent pas (Blakely et al., 1993, 1996 et 1999). Chez XerD, l'hélice α M a été identifiée comme étant essentielle pour la réaction coopérative avec XerC mais on ne sait si cette coopérativité obligatoire résulte d'un

changement structurel du substrat induit pour la recombinaison ou si elle résulte d'une interaction entre les recombinases elles-mêmes une fois liées (Sherratt et al., 1997 et Spiers et Sherratt, 1999). XerD fonctionne en *cis* avec XerC pour cliver le brin d'ADN du site lié. Des mutations chez *xerD* ont démontré que la protéine est essentielle à la recombinaison chez *dif* et *cer*. La complémentation par *xerD* mais pas par *xerC* rétablissait la recombinaison et *vice versa* lorsqu'il s'agissait d'un mutant *xerC*, démontrant l'importance de chaque recombinase dans le système (Blakely et al., 1993).

2.2.3 Le mécanisme catalytique de XerC et XerD (Structure et Fonction)

Le couple XerC XerD remplit plusieurs tâches chez *E. coli* grâce aux domaines qui composent chacune des recombinases. Ils sont impliqués dans la catalyse mais aussi dans la liaison séquence-spécifique à l'ADN, dans la formation de la synapse et dans les interactions coopératives entre XerC et XerD. La catalyse se fait d'abord à l'aide de la tyrosine conservée qui est au cœur de la réaction de clivage des brins d'ADN pour former l'intermédiaire protéine-ADN covalent. La jonction de Holliday est ainsi formée car les deux recombinases effectuent deux échanges de brins successifs (Arciszewska & Sherratt, 1995). Plus précisément, les résidus tyrosine des complexes protéine-ADN clivent d'abord les phosphates scissiles dans les sites reconnus de manière spécifique pour former des liens 3'-phosphotyrosine transitoires et des groupes 5'-hydroxyle libres. Par la suite, une attaque intramoléculaire des liens phosphotyrosine par les groupes hydroxyle résulte en un échange de la première paire de brins d'ADN.

L'intermédiaire jonction de Holliday est créé et devient par le fait même le substrat où aura lieu la deuxième ronde des étapes de clivage et d'échange de brins qui donneront les produits recombinants (Guo *et al.*, 1999). Toutefois, il faut garder à l'esprit que dans le tétramère de recombinaisons liées à l'ADN, il faut que la bonne paire de complexes protéine-ADN demeure activée et l'autre paire reste désactivée pour que ce soit les brins appropriés qui soient échangés.

XerC et XerD révèlent plusieurs aspects de leur manière d'interagir avec le site de recombinaison et de procéder à la recombinaison par leur structure même. On a maintenant une bonne idée des leurs qualités structurales grâce aux connaissances acquises depuis quelques années (Guo *et al.*, 1997 et 1999; Hickman *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 1997; Subramanya *et al.*, 1997 et Gopaul *et al.*, 1998). On a découvert que XerD comprend deux domaines (I et II) car elle a été résolue à 2.5 Å. Le domaine I s'étend des résidus 1 à 107 et le domaine II de 108 à 298. Le domaine I contient 4 hélices α disposées de manière à avoir deux structures d'hélices en épingle à cheveux parallèles arrangées à 90° l'une de l'autre. Le domaine II qui contient la tyrosine du site actif est aussi principalement en hélice α mais avec un feuillet β antiparallèle à trois brins le long d'un côté (figure 5). Le repliement de ce domaine est similaire à ce qui a été vu chez les intégrases λ (Hickman *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 1997 et Subramanya *et al.*, 1997).

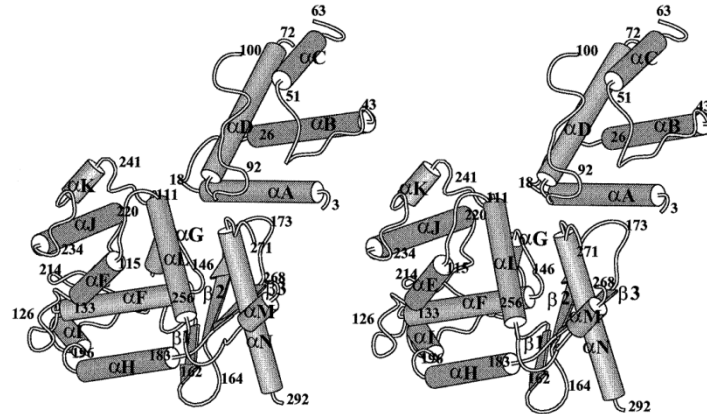


Figure 5. Structure cristallisée générale de XerD d’*E. coli*. Figure stéréo préparée à l’aide de la technique PREPPI (*predicted and experimentally determined protein-protein interactions*). Les chiffres désignent le début et la fin des éléments de structure secondaire (Subramanya et *al.*, 1997 avec permission).

La liaison à l’ADN implique les deux domaines qui interagissent avec deux séquences différentes sur le site de recombinaison. Il a été déterminé que la partie N-terminale de XerD et le résidu arginine, tout deux faisant partie du domaine I, sont nécessaires pour bien faire le lien protéine-ADN tandis que le domaine II, même sans ses résidus de liaison, n’affecte pas la capacité de liaison à l’ADN (Spiers et Sherratt 1997). Par contre, le domaine II est important pour la liaison coopérative avec XerC. S’il manque des résidus en C-terminal, entre 263 et 268, XerD perd la liaison coopérative mais garde la liaison à l’ADN. Aussi, les résidus 256 à 258 semblent être spécifiquement impliqués dans l’activation de la catalyse par XerC car une substitution tripeptidique à cet endroit n’affecte ni le clivage, ni l’échange de brin, ni la liaison coopérative mais ampute sérieusement l’activité catalyse de XerC (Hallet et *al.*, 1999). Ces deux régions sont en surbrillance dans la figure 6 et sont à l’interface de la sous-unité. XerC semble induire un repli de XerD (Blakely et Sherratt 1996). Il est en effet possible que les

interactions XerC-XerD utilisent des différences de séquence d'acides aminés entre les recombinases dans la région d'interface (Subramanya et *al.*, 1997).

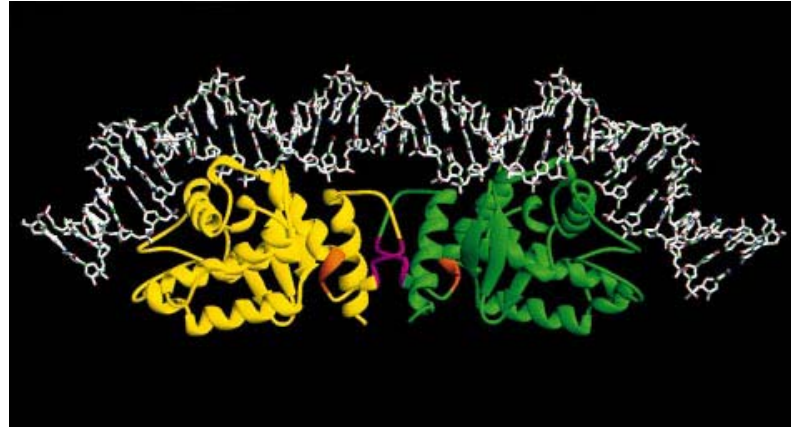


Figure 6. Modèle représentant le complexe formé par XerC, XerD et l'ADN. Les domaines catalytiques des recombinases sont montrés sous forme de rubans. Les régions impliquées dans les interactions XerC-XerD sont en orange (résidus 256 à 258) et en magenta (résidus 263 à 267) (tirée de Subramanya et *al.*, 1997 avec permission).

En tous les cas, il semble évident que l'hélice C-terminale qui contient le site actif tyrosine à une extrémité joue un rôle central dans l'interaction entre XerC et XerD. Cette interaction suggère un mécanisme simple pour expliquer que la liaison au site de recombinaison peut promouvoir le clivage de l'ADN. Un petit changement de la position de l'hélice en C-terminal peut permettre la rotation de la chaîne de côté de la tyrosine vers une position propice à l'attaque du phosphate scissile (Subramanya et *al.*, 1997).

2.3 XerS

Récemment, les connaissances sur le système *dif*/Xer ont été remises en question par la découverte chez les genres *Streptococcus* et *Lactococcus* d'un système de recombinaison atypique pour lequel une seule recombinase a été

trouvée, XerS. Elle n'a pas la séquence primaire et la taille habituellement trouvées chez la famille XerCD (Le Bourgeois et *al.*, 2007). Cette tyrosine recombinase de 356 aa est encodée par un gène (désigné comme *ymfD* jusque là chez *L. lactis* (Bolotin et *al.*, 2001)) précédé d'une séquence d'environ 50 pb hautement conservée dans un segment de 2 kb non loin de *TerC* (Le Bourgeois et *al.*, 2007). Le segment de 50 pb contient une séquence consensus de 31 pb qui s'est révélée être le site *dif* de ce système de recombinaison, lequel montrait une faible homologie avec le site *dif* d'*E.coli* (Le Bourgeois et *al.*, 2007). Cette proximité dans le génome entre la recombinase et son site est inédite dans les systèmes XerCD tout comme la taille globale de XerS qui a un domaine N-terminal plus long (figure 7).

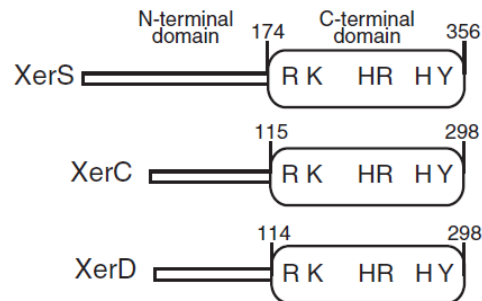


Figure 7. Comparaison entre XerS, XerC et XerD. Les diagrammes montrent la longueur et l'organisation des domaines en acides aminés. Les résidus conservés pour la catalyse sont indiqués (D'après Nolivos et *al.*, 2010 avec permission).

Cette recombinase effectue la liaison et l'échange de brin de manière asymétrique. En effet, elle adopte un lien préférentiel avec la partie gauche de son site de recombinaison, *dif_{SL}*, atypique par rapport à *dif*, et l'échange de brin se fait préférentiellement avec le brin du bas (Nolivos et *al.*, 2010). Le rôle de FtsK pourrait aussi être à revoir avec ce système puisque cette translocase si importante

dans le système classique amène assurément les sites *dif_{SL}* ensemble au septum pour la recombinaison mais elle ne semble pas activer directement l'activité d'échange des brins (Le Bourgeois et *al.*, 2007 et Nolivos et *al.*, 2010). De plus, le moteur de translocation de FtsK est requis pour activer la recombinaison chez XerS/*dif_{SL}* alors que pour le système classique la sous-unité γ de la translocase suffit à l'activation (Nolivos et *al.*, 2010). Chez *Streptococcus suis*, un mutant *xerS* montre un phénotype de chaînes anormalement longues (chaînes de plus de 30 cellules par rapport à 5 à 10 cellules à l'état sauvage). Toutefois, la complémentation restaure le phénotype normal (Leroux et *al.*, 2011). XerS de *Streptococcus suis* a 70 % d'identité et 82% de similarité avec XerS de *Lactococcus lactis* ce qui en fait une protéine assez bien conservée. XerS se lie de façon coopérative au site *dif_{SL}* et il semble que la liaison d'une deuxième recombinase au bras droit stabilise le complexe nucléoprotéique pour prévenir la dissociation (Leroux et *al.*, 2011). Aussi, XerS peut se lier de manière non-séquence spécifique à l'ADN en dehors de *dif_{SL}* (Nolivos et *al.*, 2010).

2.4 XerH

Les informations dont on dispose au sujet de XerH sont minimales. Tout ce qui en est connu repose sur des recherches d'une équipe française *in silico* seulement. En utilisant les techniques de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et *al.*, 1990) et de YASS DNA outil d'alignement par paires (Noe et Kucherov, 2005) ils ont découvert une protéine homologue à XerD dans toutes les bactéries du sous-groupe ϵ . Toutefois, la protéine correspondante avait un

faible degré d'homologie avec XerD d'*E. coli* et était plus longue (entre 353 et 363 aa contre 298 aa pour XerD). Étonnamment, aucune autre recombinase putative pouvant correspondre à un homologue de XerC n'a été trouvée. En effet, une analyse BLASTp avec XerC d'*E.coli* a montré la présence de recombinases ressemblant à XerC mais aucune n'était trouvée chez les genres *Helicobacter* et *Campylobacter*. Certaines de ces recombinases «*XerC-like*» correspondent probablement aux recombinases élément-associées transposables trouvées chez *Helicobacter* et décrites comme «XerT» (Kersulyte et al., 2009). C'est alors qu'il est devenu évident que le sous-groupe d' ϵ -protéobactéries pathogènes, dont *Helicobacter* et *Campylobacter* font partie, exprime une seule recombinase Xer qui a été désignée comme étant «XerH» car *Helicobacter* est un représentant majeur de ce groupe. En outre, on connaît maintenant des espèces ayant un système Xer fonctionnant avec une seule recombinase, XerS, décrite plus haut (Nolivos et al., 2010). On a donc comparé XerS (356 aa) et XerH et malgré leur similarité en termes de taille, on a constaté qu'elles étaient phylogénétiquement distinctes. Cela impliquait qu'une recombinase Xer inédite et un tout nouveau système de recombinaison ont été potentiellement mis au jour (Carnoy et Roten, 2009).

2.5 Le site d'action des recombinases Xer

Généralités

Des sites spécifiques sur l'ADN sont reconnus par les recombinases Xer. C'est là qu'elles se lient pour effectuer les clivages et les échanges de brins. Ces

sites peuvent se situer dans le chromosome, comme *dif* d'*E. coli*, ou dans des plasmides naturels (Tableau I), comme *cer* de ColE1 ou *psi* de pSC101.

Le site *dif* minimal est de 28 pb chez *E.coli* et de 31 pb chez *Streptococcus* et *Lactococcus*. Dans ce dernier cas, le site *dif* montre une homologie faible avec le site dit classique puisqu'il est le substrat d'une seule recombinase (Le Bourgeois et al., 2007; Nolivos et al., 2010 et Leroux et al., 2011). Quant à *cer* et *psi*, ils consistent en un site central, où XerCD se lie, et en séquences accessoires adjacentes en amont, mesurant environ 180 pb, sur lesquelles des protéines de séquence accessoires, ArgR et PepA, se lie (Stirling et al., 1988; Colloms et al., 1997). La recombinaison sur *psi* se produit par des échanges de brins séquentiels par XerC et XerD alors que sur *cer*, on n'a observé qu'une formation d'intermédiaire jonction de Holliday médiée par XerC (Colloms et al., 1996).

Le site *dif* a été identifié chez un grand nombre de bactéries (Tableau I) et sous différentes formes mais il demeure que le site de recombinaison se divise en trois parties : deux sites de liaison spécifique des recombinases et une région centrale «*spacer*» où l'échange de brin a lieu. Comme on peut le voir au tableau 1, la longueur du site varie entre 28 et 31 bp avec 11 (chromosomique) ou 13 (plasmidique) paires de base pour le site de liaison des recombinases et 6 à 11 pb pour la région centrale. Les «bras» du site *dif* où se lie les recombinases ne sont pas aussi conservés l'un que l'autre. Le bras droit (où se lie XerD) est bien mieux conservé que le bras gauche où se lie XerC. Cela confère à XerD une capacité de liaison interspèce plus forte (Blakely et Sherratt, 1994). Pour ce qui est de la

région centrale du site de recombinaison, on a observé son rôle charnière en termes de conformation pour l'efficacité de la recombinaison car si elle est longue de 6 pb (comme chez Xer et Cre) les phosphates scissiles sont structurellement presque parfaitement superposés alors que dans le cas d'une région de 7 ou 8 pb (Int et Flp), on observe un décalage de 36° et de 72° entre ces mêmes liens (Grainge et Jayaram 1999). Par ailleurs, les sites de recombinaison de plusieurs intégrases sont structurellement similaires à ceux des topoisomérases eucaryotes (Cheng et *al.*, 1998 et Cao et Hayes, 1999).

Tableau I : Alignement de séquences de sites de recombinaison de plasmides et de bactéries (Tableau constitué à partir de données de Hayes et Sherratt, 1997; Lesterlin et *al.*, 2004; Carnoy et Roten, 2009 et Nolivos et *al.*, 2010)

Origine	Site de liaison XerC	Espacement	Site de liaison XerD
Sites plasmidiques			
ColE1 cer	GGTGCGTACAA	TTAAGGGA	TTATGGTAAAT
ColA car	GGTGCGTACAA	--CGGATG	TTATGGTAAAT
CloDF13 parB	GGTACCGATAA	--GGGATG	TTATGGTAAAT
ColK ckr	GGTGCGTACAA	TTAAGGGA	TTATGGTAAAT
NPT16	GGTGCGCGTAA	-TGAGACG	TTATGGTAAAT
pMB1	GGTGCGTACAA	TTAAGGGA	TTATGGTAAAT
pSC101 psi	GGTGCGCGCAA	--GATCCA	TTATGTTAAAT
ColE2	GGGGCGTACAA	--CGGGAG	TTATGGTAAAT
ColE3	GGTGCGTACAA	--CGGGAG	TTATGGTAAAT
ColE4-CT9	GGTGCGTACAA	--CGGGAA	TTATGGTAAAT
ColE5-099	GGTACGTACAA	--CGGGAG	TTATGGTAAAT
ColE-CT14	GGTGCGTACAA	--CGGGAG	TTATGGTAAAT
ColE-K317	GGTGCGTACAA	--CGGGAG	TTATGGTAAAT
ColE9-J	GGTACGTACAA	--CGGGAG	TTATGGTAAAT
Sites chromosomiques (dif)			
<i>E. coli</i>	GGTGCGCATAA	--TGTATA	TTATGTTAAAT
<i>S. Typhimurium</i>	GGTGCGCATAA	--TGTATA	TTATGGTAAAT
<i>V.cholerae chrI</i>	GGTGCGCATAA	--TGTATA	TTATGGTAAAT
<i>V.cholerae chrII</i>	ATGGCGCATTAA	--TGTATG	TTATGGTAAAT
<i>H.influenzae</i>	AATGCGCATTAA	--CGTGCG	TTATGGTAAAT
<i>B.subtilis</i>	ATTTTCGCATAA	--TATAAA	TTATGGTAAAT
<i>C.crescentus</i>	ACTTCCTAGAA	--TATATA	TTATGTAAACT
<i>P.mirabilis</i>	GGTTCGCATAA	--TGTATA	TTATGTTAAAT
<i>S.aureus</i>	ACTTCCTATAA	--TATATA	TTATGTAAACT
Séquence consensus	A		TTATG AA
<i>Campylobacter jejuni</i>	TTTTGTATTGA	AAACTGTAATT	TTCAAACCTT
<i>Helicobacter pylori</i>	TTTAGTTATGA	AAACTGCACTT	TTCAAACCTT
<i>Streptococcus suis</i>	ATTTTTCGGAA	AAACTATAATT	TTCTTGAAA
Séquence consensus	-TT--T----A	AAACT--A-TT	TTC-----

2.5.1 Le site de recombinaison chromosomique

Le site *dif* est le site privilégié pour la résolution des dimères chromosomiques. Il est trouvé chez des centaines d'espèces à chromosome circulaire unique (il a été repéré dans 641 bactéries chez 16 phyla différents avec une identité de 97,64% (Kono et *al.*, 2011)). Aussi, certaines caractéristiques sont récurrentes par rapport à ce site. Par exemple, il est dans des régions non-codantes, il est en association étroite avec le terminus de réplication, il contient peu de G+C et est partiellement palindromique (Clerget 1991 et Hayes et Sherratt 1997). Aussi, le G+C skew (seuil où C devient en excès par rapport à G à cause des différents processus de mutation/substitution affectant les deux brins de l'ADN) où on retrouve souvent le site *dif* montre qu'il pourrait être le lieu de la terminaison de la réplication. Toutefois, un nouvel éclairage montre que certains sites *dif* ne sont pas au G+C skew, vraisemblablement parce que la terminaison de la réplication ne se produit pas qu'à ce site (Kono et *al.*, 2011).

2.5.1.1 Le site *dif* d'*E. coli*

Le site *dif* d'*E. coli* est sans conteste le mieux connu des sites découverts jusqu'à présent. Il a été identifié dans le locus de terminaison entre *TerA* et *TerC*, des sites de terminaison de la réplication situés complètement à l'opposé d'*oriC* (figure 8). Positionné à 33.6 min, le site *dif*, à l'instar des autres composantes de la recombinaison Xer, cause un phénotype de cellules en filaments avec des nucléoides aberrants dans 10 à 15% des cellules s'il est muté.

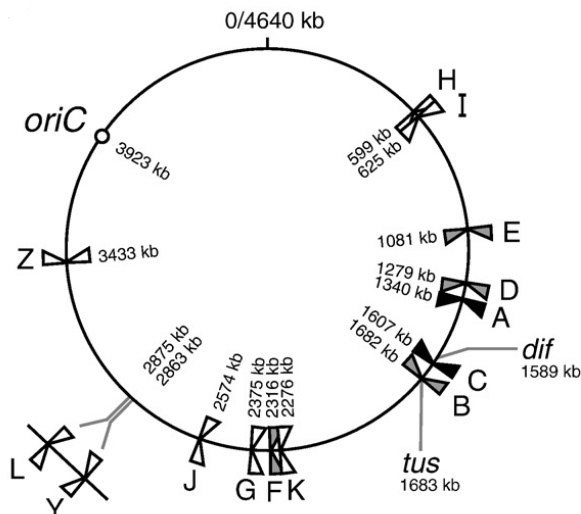


Figure 8. Position et orientation des séquences *Ter* chez *E. coli*. Les séquences sont représentées par rapport à *dif* et *oriC*. Les lettres représentent le suffixe de chaque *Ter* tandis que les flèches représentent l'orientation des séquences. Les flèches noires sont pour les *Ter* fonctionnant dans le chromosome à l'état sauvage, les flèches grises sont pour les *Ter* analysés sous conditions artificielles seulement et les flèches blanches sont pour les séquences identifiées par similarité de séquence (tiré de Duggin et Bell, 2009 avec permission).

De plus, le mutant active une réponse SOS et inhibe la croissance (Blakely et al., 1991; Kuempel et al., 1991; Cornet et al., 1994 et Sherratt et al., 1995). L'emplacement du site *dif* demeure primordial dans la région de terminaison de réplication du chromosome car si on complémente le mutant par un site apparenté comme *cer* on note que le phénotype normal n'est vraiment rétabli que lorsque *cer* est intégré à la position normale de *dif* (Tecklenburg et al., 1995). La complémentation est exécutée à l'aide d'un plasmide contenant 530 pb du locus de *dif* dans lesquelles 33 pb sont dérivées de *cer*. Le site *dif* dans le chromosome peut également être remplacé par *psi* (Cornet et al., 1994) ou par *loxP* (site de résolution du phage P1) (Leslie et Sherratt, 1995). Quoiqu'il en soit, *dif* doit se trouver dans la zone DAZ (*dif* activity zone) mesurant de 15 à 20 kb où se produit

la recombinaison site-spécifique chromosomique (Pérals et *al.*, 2000 et 2001). On trouve dans le génome de courtes séquences polarisées (RRNAGGGS) sur le brin avancé, s'étendant d'*oriC* à *dif*, R désignant une purine, S désignant un G ou un C et N étant pour toutes les bases azotées. Cette polarisation est observable à l'extérieur de la DAZ (Salzberg et *al.*, 1998 et Capiaux et *al.*, 2001). En fait c'est la polarisation de l'ADN qui crée la DAZ car même si on supprime les 150 kb autour de *dif* on voit qu'il y a toujours une DAZ (Pérals et *al.*, 2000). L'activité de *dif* requiert une orientation appropriée des séquences adjacentes. Cela montre que les éléments polarisés du chromosome pourraient contrôler la dynamique de mouvements du nucléoïde lors de la division (Pérals et *al.*, 2000). Les séquences KOPS (*FtsK-orienting polar sequences*) sont également importantes pour l'activité de translocation de FtsK vers *dif*. Elles permettent à FtsK de mobiliser les sites de recombinaison des chromosomes concaténés pour qu'ils soient face à face (Capiaux et *al.*, 2001).

Par ailleurs, le site *dif* n'a pas besoin de séquences accessoires où se lieraient d'autres protéines que les Xer pour la recombinaison. Cela permet d'éliminer la sélectivité de résolution qui est inhibée par d'autres sites de recombinaison Xer. Ainsi, la multimérisation et la résolution sont détectées lorsque *dif* est placé sur un substrat plasmidique (Blakely et *al.*, 1991).

2.5.1.1.1 Structure

Comme mentionné plus haut, le site *dif* d'*E. coli* consiste en une région centrale (6 pb) entourée de deux sites de liaison spécifiques à leur recombinase

(11 pb chacun) pour un total de 28 pb (Leslie et Sherratt, 1995; Tecklenburg et *al.*, 1995) et Hayes et Sherratt, 1997). Aux frontières de la région centrale se produisent les clivages et les échanges de brins aussi bien de manière intra qu'intermoléculaire. Bien que les sites de liaison soient des palindromes partiels, ils sont reconnus spécifiquement par XerC et XerD (Blakely et *al.*, 1993). Par contre, la force de liaison des recombinaisons est inégale car XerD se lie mieux que XerC. De plus, le site de XerD est mieux conservé. C'est pour cette raison que la coopérativité entre ces protéines est importante, XerD compense pour la faible liaison de XerC en interagissant fortement avec elle (Hayes et Sherratt, 1997). Lorsqu'on compare les deux sites de liaison on note que six des onze nucléotides qui les composent sont palindromiques. Ceux-ci ne pouvaient donc pas être responsables de l'exclusivité des sites de liaison. Les cinq nucléotides restants de chaque côté (tous ou en partie) doivent donc être décisifs (positions -14, -13 et -11 à -9 et +9 à +11, +13 et +14). En fait, pour le bras gauche (XerC) -13, -11 et -10 ne sont jamais palindromiques avec +13, +11 et +10 du bras droit (XerD) (Figure 9).

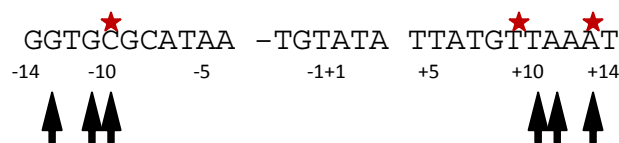


Figure 9. Séquence du site *dif* d'*E. coli*. Les flèches pointent les positions qui demeurent toujours asymétriques entre les sites de liaison de XerC et XerD. Les étoiles rouges représentent les nucléotides essentiels à la liaison des recombinaisons spécifiques à chaque bras. (Adapté d'après Hayes et Sherratt, 1997).

Des mutagénèses ont permis de constater que -10 est essentiel pour le bras XerC (la protéine ne pouvait se lier au site muté à cette position *in vitro*) et

que +9 et +13 sont essentiels pour la liaison de XerD (représentés par des étoiles dans la figure 9) (Hayes et Sherratt, 1997).

2.5.1.1.2 Lien entre recombinaison, division cellulaire et structure chromosomique

Comment la cellule peut-elle «savoir» qu'il ne faut recombinaison que les dimères chromosomiques ? Cette question relève du contrôle de la recombinaison *dif*/Xer. D'abord, chaque site *dif* des chromosomes concaténés doit se trouver au septum (Pérals et *al.*, 2000). FtsK veille à cela en positionnant les deux *dif* pour le clivage et l'échange des brins. Ensuite, on a remarqué qu'une souche *recA*⁻ ne pouvait activer spécifiquement DAZ. Cela laisse à penser que la recombinaison ne peut se produire qu'en présence de dimères tout en étant inactive en présence de monomères. Ainsi, l'induction par DAZ est spécifique aux dimères. On comprend alors que les dimères présentent une structure et un emplacement intramoléculaire de la région de *dif* différent par rapport aux monomères. Cela permet de former un complexe XerCD sur *dif* à l'aide de FtsK.

FtsK, de part sa position au septum, fait en sorte que la recombinaison ne peut avoir lieu qu'à cet endroit, juste avant la fin de la division cellulaire ce qui implique un principe de co-localisation des protagonistes de la recombinaison au même endroit pour induire une résolution (figure 10) (Pérals et *al.*, 2001). S'il y a un dimère, les sites *dif* sont menés vers le septum grâce aux DAZ et c'est seulement là que FtsK peut activer la recombinaison.

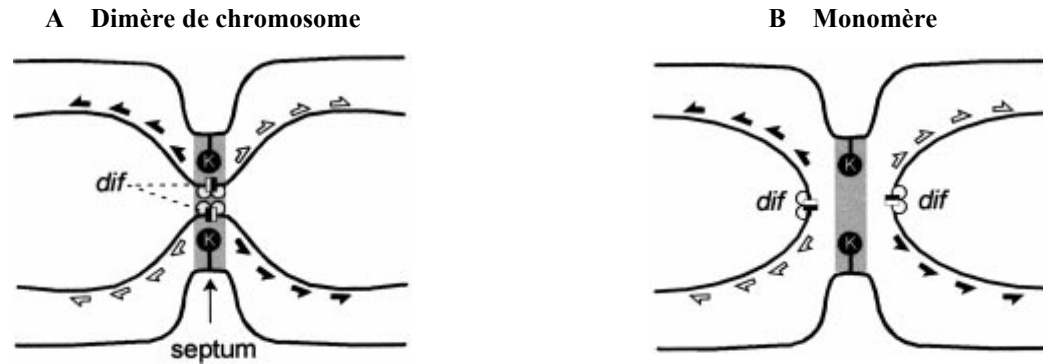


Figure 10. Le modèle de «co-location». Ces schémas représentent la partie centrale de la cellule en division durant la constriction du septum. Les cercles blancs représentent les recombinaases et les cercles noirs avec K représentent FtsK. Les flèches noires représentent quelques éléments organisateurs du chromosome impliqués dans la formation de DAZ à leur point de convergence. La région grise représente la zone où les sites *dif* doivent se situer pour accéder aux facteurs activateurs associés au septum. (tiré de Péral et al., 2001 avec permission).

Dans la figure 10 en A, dans le cas des dimères, la région de *dif* peut rester coincée au septum et l'interaction du complexe XerCD-*dif* avec des facteurs comme FtsK conduit à l'activation de la recombinaison et donc à la résolution du dimère. En B, dans le cas de monomères ou après la résolution, la ségrégation ou la structure chromosomique empêcheraient les sites *dif* d'accéder au septum.

2.5.1.2 Le site *dif_{SL}* des streptocoques et lactocoques

La recherche d'un site de recombinaison *dif_{SL}* n'a identifié aucune séquence similaire avec les sites déjà connus. Toutefois, la découverte d'un homologue de XerD suggérait la présence d'un site de recombinaison

correspondant quelque part dans le génome. C'est finalement tout près de *xerD* (50 pb en amont) qu'une séquence conservée chez *Streptococcus* et *Lactococcus* a été trouvée. Déjà, il s'agissait d'une différence entre ce système et le système classique pour lequel les gènes encodant les recombinases sont très éloignés du site de recombinaison (Le Bourgeois et *al.*, 2007). Les streptocoques et les lactocoques représentent un groupe phylogénétique relativement homogène. Ils définissent ensemble la famille taxonomique des *Streptococcaceae*, parmi les firmicutes lorsqu'ils sont comparés à d'autres genres comme *Clostridium* et *Lactobacillus* (Makarova et Koonin, 2007 et Henz et *al.*, 2005). Il est légitime de penser que l'acquisition du système XerS aurait pu remplacer le système XerCD au moment de leur séparation des autres firmicutes ou peu après, certainement lors d'un évènement confirmant la différenciation (Le Bourgeois et *al.*, 2007).

2.5.1.2.1 Structure

dif_{SL} mesure 31 pb et montre une faible homologie avec le site *dif* d'*E. coli*. La conformation en *cis* n'est pas essentielle pour une recombinaison efficace mais cela laisse à penser qu'il y a une pression sélective pour garder cet arrangement. Etant donné la proximité de *dif_{SL}* et *xerS* dans le génome, il est possible que le site soit entre l'ORF de *xerS* et son promoteur ou carrément dans le promoteur. Si cette dernière hypothèse est confirmée, cet arrangement inhabituel pourrait indiquer un mécanisme régulateur dans lequel la liaison de XerS au site *dif_{SL}* autorégulerait l'expression de *xerS* (Le Bourgeois et *al.*, 2007). Chez *L. lactis*, le site *dif_{SL}* montre une asymétrie entre le bras gauche et le bras droit en termes de longueur et de séquence (le bras gauche a 2 pb de plus que le

droit). La liaison de XerS est plus forte au demi-site gauche suggérant qu'un premier monomère de XerS se lie au bras gauche d'abord puis recrute rapidement un deuxième monomère qui se lierait alors au bras droit pour former le complexe nucléoprotéique (Leroux et *al.*, 2011). De plus, la région centrale de *dif_{SL}* est longue de 11 pb contrairement à 6 à 8 pb dans la majorité des cas connus à ce jour (figure 11) (Leroux et *al.*, 2011). On sait qu'une région centrale de 12 pb est trouvée chez l'intégration du phage CTX médiée par XerC dans *Vibrio* (Val et *al.*, 2005).

ATT <u>TTTCCGAA</u>	AAACTATAATT	<u>TTCTTGAAA</u>
Bras gauche	Spacer	Bras droit

Figure 11. Le site *dif_{SL}*. Les nucléotides soulignés indiquent les motifs conservés suggérés par Leroux et *al.*, 2011 comme étant les points de contacts avec la recombinase.

L'espace entre les deux motifs est plus grand d'un nucléotide au bras droit. Cela laisse croire que c'est ce qui affaiblit la liaison à se bras et rend nécessaire l'aide du monomère lié au bras gauche (Leroux et *al.*, 2011).

2.5.1.2.2 Le site *dif_{SL}* versus le site *dif_H*

Le site *dif_H* et le site *dif_{SL}*, ne sont pas reliés phylogénétiquement parlant (figure 17). De plus, *xerH* et *dif_H*, contrairement à *xerS* et *dif_{SL}*, ne sont pas à proximité dans le génome.

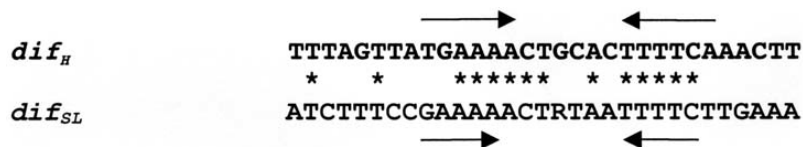


Figure 12. Alignement de *dif_H* et *dif_{SL}*. La séquence de *dif_H* correspond au site putatif de *Helicobacter pylori*. Les astérisques indiquent les nucléotides communs et les flèches désignent les répétitions inversées (tirée de Carnoy et Roten, 2009 avec permission).

Le site de *dif_H* possède les caractéristiques générales de *dif_{SL}* : deux séquences inversement répétées hautement conservées séparées par une région centrale (figure 12). Ces comparaisons restent à confirmer en laboratoire.

2.6 Facteurs accessoires

ArgR et PepA sont les facteurs accessoires qui participent à la recombinaison plasmidique de ColE1 au site *cer*. D'abord appelés *xerA* et *xerB*, leur nomination a été ajustée après la découverte du type d'activité qu'ils codaient. ArgR est pour «répression de l'arginine» car ce facteur se lie à la boîte ARG se trouvant à 100 pb dans les séquences accessoires en amont de *cer* et induit un plus grand enroulement de la double hélice nucléotidique afin de rapprocher les sites de recombinaison situés l'un à la suite de l'autre sur l'ADN (Stirling et *al.*, 1992 et Tian et *al.*, 1992). Quant à PepA, le nom est pour «aminopeptidase A», il s'agit d'un hexamère en solution formé de six sous-unités identiques de 55 kDa (Alen et *al.*, 1997). Il s'agit d'ailleurs d'une aminopeptidase majeure d'*E.coli* faisant partie d'une famille d'aminopeptidases très répandue présente chez les mammifères, les plantes et les bactéries (Cuyper et *al.*, 1982 ; Bartling et Weiler, 1992 ; Burley et *al.*, 1992 et Wood et *al.*, 1993). ArgR et PepA ainsi que leurs 180 pb de séquences accessoires pour *cer* permettent d'assurer que la recombinaison *cer* est exclusivement intramoléculaire (Senechal et *al.*, 2010).

Ainsi, ArgR est en sandwich entre deux PepA sur les séquences accessoires durant la recombinaison, il y a ensuite un tour de 60pb puis un autre PepA juste avant les sites de XerC et XerD (Strater et *al.*, 1999).

Pour ce qui est de la recombinaison Xer chromosomique, les recombinases n'ont pas besoin de séquences accessoires mais l'ADN doit être mobilisé et la recombinaison initiée. Pour ce faire la translocase FtsK joue un rôle prépondérant (Yates et *al.*, 2006).

2.6.1 **FtsK**

Cette translocase à trois domaines est située au septum et elle joue un rôle important dans plusieurs fonctions cellulaires telles que la division cellulaire, la résolution de dimères et la ségrégation des chromosomes (Liu et *al.*, 1998, Draper et *al.*, 1998 ; Yu et *al.*, 1998 ; Capioux et *al.*, 2001 ; Aussel et *al.*, 2002 et Ip et *al.*, 2003). Pour la recombinaison site-spécifique Xer, elle permet de mobiliser les sites *dif* des dimères au septum afin qu'ils soient alignés pour être dans la portée des recombinase et elle active la recombinaison par un contact direct avec XerD (Dubarry et Barre, 2010). On la trouve de manière hautement conservée chez les bactéries avec sensiblement les mêmes fonctions (Biller et *al.*, 2009). FtsK est une protéine membranaire de 1329 aa composée de 3 domaines : le domaine membranaire en N-terminal de 179 aa, le domaine C-terminal avec activité translocase de 500 aa et entre les deux se trouve le domaine «*linker*» de 588 aa dont on commence à peine à comprendre le rôle (figure 13).

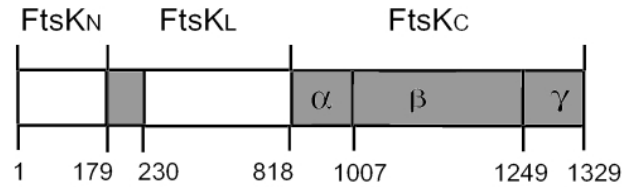


Figure 13. Schéma de FtsK. FtsK_N représente la partie N-terminale, FtsK_L représente le domaine «*linker*» et FtsK_C représente le domaine C-terminal lui-même composé de trois sous-unités (tirée de Yates et *al.*, 2006 avec permission).

Le domaine C-terminal est le plus important pour la recombinaison Xer car il favorise la synapse entre les sites *dif* dans la zone du septum avant l'activation de la recombinaison (Pérals et *al.*, 2000 ; Bigot et *al.*, 2004 et Pease et *al.*, 2005). Il se divise en trois sous-domaines : α , β et γ (figure 13). Les sous-domaines α et β composent le moteur de la translocation alors que le sous-domaine γ régule la liaison de l'ADN avec les recombinases (Barre et *al.*, 2000 ; Massey et *al.*, 2006 ; Sivanathan et *al.*, 2006 et Yates et *al.*, 2006). Ce domaine catalyse un «commutateur» ATP-dépendant dans la conformation du complexe ADN-protéine qu'est XerCD-*dif* pour permettre à XerD d'initier la recombinaison (Aussel et *al.*, 2002). Un pli ATPase de type RecA forme des hexamères autour de l'ADN double brin (Massey et *al.*, 2006 ; Saleh et *al.*, 2004 et 2005). La forme active biochimiquement du domaine FtsK_C, FtsK_{50C}, peut stimuler le clivage par XerD. L'interaction entre un sous-domaine non-moteur de FtsK_C de 62 aa et le C-terminus de XerD stimule le clivage de substrats suicide (Yates et *al.*, 2006). Le domaine C-terminal pourrait également faciliter la ségrégation des chromosomes en organisant les régions *ter* nouvellement répliquées (Lesterlin et *al.*, 2004). *In vitro*, ce domaine seul suffit à obtenir une recombinaison complète démontrant

son rôle central dans la fonction globale de FtsK de part la stimulation qu'il effectue (Aussel et *al.*, 2002).

Plus précisément, le moteur translocase ATP-dépendant, composé des sous-unités α et β , effectue la translocation dirigée de l'ADN à environ 5kb par seconde et ce, en ôtant les protéines accrochées (Aussel et *al.*, 2002; Saleh et *al.*, 2004 ; Pease et *al.*, 2005 ; Sivanathan et *al.*, 2006 et 2009 ; Lowe et *al.*, 2008 et Graham et *al.*, 2010 a et b). Le sous-domaine γ est celui qui confère les fonctions les plus importantes du domaine C-terminal car il reconnaît les KOPS et c'est par lui que se fait le contact avec XerD pour former la jonction de Holliday, sans quoi c'est XerC qui fait la jonction et la défait par une deuxième catalyse (Barre et *al.*, 2000 ; Aussel et *al.*, 2002 et Sivanathan et *al.*, 2006).

Le domaine N-terminal de FtsK est composé de quatre segments transmembranaires qui permettent à la protéine de s'ancrer solidement à la membrane lorsqu'elle dirige l'ADN vers le septum, il est aussi important pour la division cellulaire pour laquelle il recrute des protéines spécifiques (Chen et Beckwith, 2001 ; Dubarry et Barre, 2010). Sans ce domaine, les cellules meurent suite à la formation de filaments (Draper et *al.*, 1998).

Le domaine «*linker*» semble avoir une importance de taille plutôt que de séquence. De récentes découvertes ont permis de montrer son importance pour l'accessibilité à l'ADN car l'efficacité de la résolution de dimère dépend de la longueur du «*linker*» (Dubarry et Barre, 2010). Contrairement aux autres domaines de FtsK, le «*linker*» est moins conservé parmi les espèces exprimant

cette translocase. Quoi qu'il en soit, ce domaine est important pour la recombinaison et la division cellulaire (Dubarry et Barre, 2010).

Bien que FtsK soit recrutée à un stade précoce de la formation du septum, la recombinaison *dif*/Xer ne se produit que bien plus tard lorsque la paroi cellulaire est en constriction (Kennedy et al., 2008). Ceci suggère que FtsK pourrait initier le transport de l'ADN avant la fusion de membrane à un moment où il y a encore une ouverture au septum conscrit (Dubarry et Barre, 2010). L'initiation du transport et le transport lui-même est possible grâce à de courtes séquences polaires reconnues par FtsK, les KOPS pour *FtsK Orientating Polar Sequences*. Elles sont longues de 8 pb avec une séquence conservée : 5'-GGGNAGGG-3' (Bigot et al., 2005 et 2006; Levy et al., 2005 et Sivanathan et al., 2006). En effet, c'est en interagissant avec ces séquences que l'hexamère de FtsK se forme et que le sous-domaine γ peut activer la translocation ATP-dépendante et l'orienter car les KOPS «pointent» vers le site *dif* (Bigot et al., 2006). Si les KOPS sont dans une orientation non-permissive, le sous-domaine γ inhibe la translocation (Sivanathan et al., 2006). Aussi, des trimères covalents de FtsK $\alpha\beta\gamma$ sont capables de se dimériser et former des hexamères pouvant reconnaître les KOPS, faire de la translocation et activer la recombinaison à des vitesses comparables à celles de FtsK C-terminal. En outre, des trimères ayant une sous-unité inactive à la position centrale forment des hexamères pouvant effectuer une translocation rapide mais qui sont incapables de déplacer des protéines et autres obstacles sur l'ADN (Croizat et al., 2010).

Enfin, FtsK ne se dissocie pas une fois qu'elle rencontre le site *dif* et qu'elle a activé XerD car elle permet de stabiliser l'ADN, de le protéger contre les bris et d'éviter des recombinaisons homologues (Graham et *al.*, 2010).

Par ailleurs, dans le cas des systèmes à une seule recombinase il reste bien des découvertes à faire mais on sait que l'interaction FtsK-Xer demeure bien conservée si bien que FtsK est interchangeable entre des espèces à deux recombinases et des espèces à une seule recombinase (Nolivos et *al.*, 2010). Par contre le sous-domaine γ semble activer de manière différente XerCD-*dif* et XerS-*dif_{SL}* car s'il suffit à activer la recombinaison XerCD-*dif* seul, ce n'est pas le cas pour XerS-*dif_{SL}* qui nécessite le moteur de translocation en addition à ce sous-domaine (Nolivos et *al.*, 2010).

2.7 Régulation du système de recombinaison *dif*/Xer

En définitive, la recombinaison *dif*/Xer ne se fait que lors d'événements de chromosomes concaténés. Les sites *dif* des deux chromosomes fils, situés obligatoirement dans la DAZ dans la région de terminaison de la réplication, doivent se rencontrer au septum pour résoudre le dimère. La polarisation de l'ADN chromosomique permet de diriger la translocation de FtsK vers les sites de recombinaison. C'est alors que les tyrosines recombinases Xer entrent en jeu et forment un complexe avec le site *dif* et FtsK qui initie la recombinaison grâce à un contact direct avec XerD.

FtsK joue un important rôle dans la régulation de la recombinaison *dif*/Xer car elle reconnaît si les séquences sont orientées correctement pour mobiliser les sites *dif* au septum. Dans le cas contraire, la translocation ne

s'effectue pas. Aussi, elle ne permet la recombinaison qu'au site *dif* puisque c'est là qu'elle s'arrête, stabilise l'ADN et stimule XerD. Enfin, elle assure que la recombinaison se produit au septum par son ancrage dans la membrane consécrite (Lesterlin et *al.*, 2004 ; Yates et *al.*, 2006 et Nolivos et *al.*, 2010).

2.7.1 Contrôle de la recombinaison homologue

La recombinaison homologue est un processus important chez les bactéries. Elle permet de réparer l'ADN brisé qui compromet la réplication et de créer de la diversité génétique. Un nombre impair de recombinaisons homologues peut produire les dimères chromosomiques résolus par *dif*/Xer. Plus spécifiquement, c'est une recombinaison réciproque entre les molécules des chromosomes fils ou un bris à proximité d'une fourche de réplication conjugué à une invasion par une boucle d'ADN intact d'une extrémité double brin qui engendrent des dimères (Kuzminov, 1995). Ces dimères surviennent dans 10 à 15% des cellules car l'échange de séquences entre les chromosomes fils (*Sister Chromatid Exchange*) n'est pas très fréquent (figure 14) (Cornet et *al.*, 1996 ; Steiner et Kuempel, 1998 ; Pérals et *al.*, 2000 et Lesterlin et *al.*, 2004).

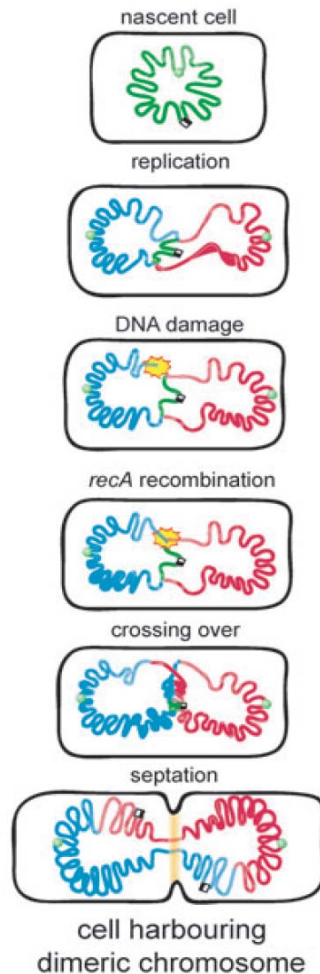


Figure 14. Formation de dimères de chromosomes. Cellule en réplication dont les chromosomes fils sont en rouge et bleu alors qu'*oriC* est le point vert. Les carrés noirs et blanc sont les sites *dif*. Le flash jaune représente une réparation de bris double brin par une voie RecA qui résulte en un «cross over» qui engendre le dimère qui demeure jusqu'à la septation (ligne jaune). (Lesterlin et *al.*, 2004 avec permission).

La recombinaison homologue par RecA s'effectue de deux manières. La voie RecBC dépendante répare les bris double brin par le complexe RecBCD. La voie RecF dépendante, quant à elle, traite les bris simple brin par RecFOR (Cox et *al.*, 2000). Cette dernière voie n'est en général requise que si RecBCD est absent lorsqu'il s'agit d'évènements autres que la réactivation de fourche de réplication. En outre, les deux voies engendrent des jonctions de Holliday qui sont résolues

par le complexe RuvABC entre autres (Van Gool et *al.*, 1999 ; Cromie et Leach, 2000 et Michel et *al.*, 2000).

3. *Campylobacter jejuni*

Campylobacter jejuni est un bacille incurvé à Gram négatif dont le type respiratoire est micro-aérophile (concentration d'O₂ inférieure à 20 %). Elle fait partie de la classe des ε-protéobactéries qui comprend des genres comme *Helicobacter sp.* et *Acrobacter sp.*. Il s'agit d'un microorganisme pathogène plutôt original en matière de mobilité. En effet, il se présente sous forme spiralée et possède un à deux flagelles polaires qui peuvent devenir très longs et lui permettent d'adopter un déplacement dit en «vol de moucheron» (figure 15). Ces flagelles l'aident à se faufiler dans le mucus mais aussi à sécréter des molécules impliquées dans la régulation de la virulence, ce qui en fait un pathogène à propagation rapide (Altekurse et *al.*, 1999 et Guerry, 2007).

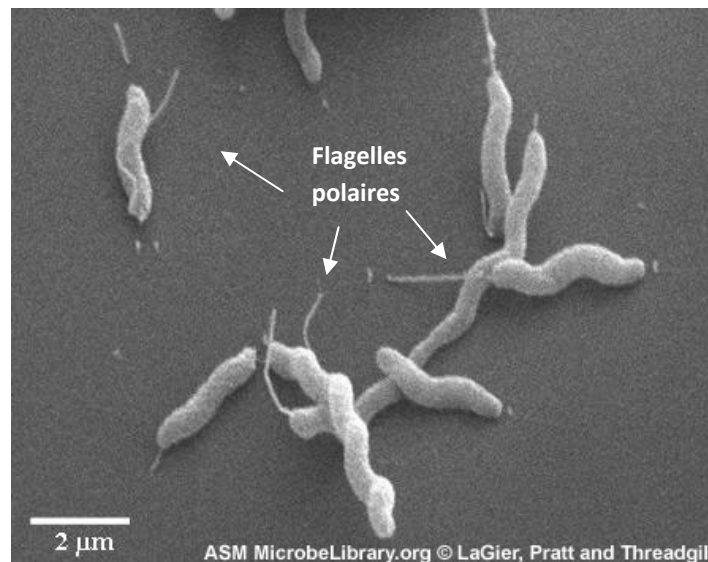


Figure 15. Numérisation d'un micrographe à électron représentant quelques cellules de *Campylobacter jejuni*. Les flagelles polaires sont bien visibles sur plusieurs cellules. (D'après LaGier et *al.*, 2008).

Cette bactérie est celle qui est le plus souvent mise en cause lors de gastroentérites bactériennes dans le monde, provoquant de 400 à 500 millions de cas déclarés de diarrhées chaque année (Ruiz-Palacios, 2007). Son réservoir principal demeure la volaille et c'est ainsi que sa température de croissance optimale est de 42°C. Ce pathogène peut être trouvé sur plus de 90% des carcasses de poulet et c'est par ce support, par contamination croisée, si cru ou mal cuit, mais aussi par l'eau qu'il est transmis à l'humain. La campylobactériose aiguë, qui est caractérisée par de la fièvre, de sévères crampes abdominales et des diarrhées sanguines et contenant des leucocytes. Elle est associée avec une invasion des cellules intestinales par *C. jejuni* (Eucker et Konkel, 2011). La transmission à l'humain se fait selon le cycle suivant (figure 16).

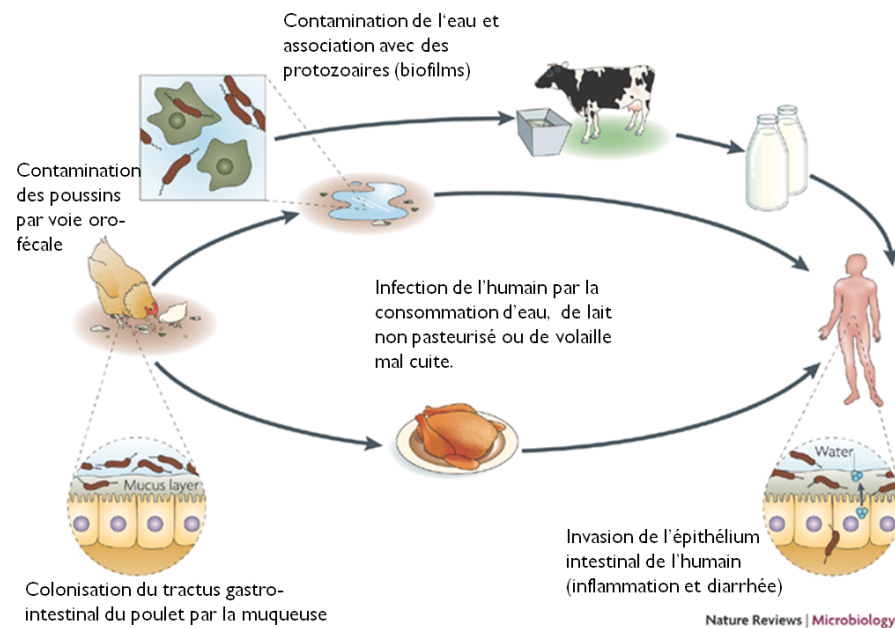


Figure 16. Les sources et les conséquences de l'infection par *Campylobacter jejuni*. Plusieurs réservoirs mènent à l'infection chez l'homme dont le poulet, l'eau (où elle peut s'associer à des protozoaires pour possiblement former des biofilms), le lait non pasteurisé ou la viande. Le tout pour causer une

inflammation de l'intestin et donc la diarrhée (adaptée d'après Young et *al.*, 2007).

Des complications locales peuvent survenir lors de campylobactérioses en raison d'une propagation directe à partir du tractus intestinal. Celles-ci incluent des pancréatites, des péritonites et des hémorragies gastro-intestinales massives. Des bactériémies transitoires chez certains hôtes immunocompétents avec des entérites à *C. jejuni* seraient plus communes mais ne sont pas détectées car la plupart des souches sont rapidement éliminées par l'action létale du sérum humain normal et parce que des cultures de sang ne sont pas souvent effectuées pour les patients (Allos, 2001). Des séquelles post-infection graves peuvent apparaître suite à des campylobactérioses. La plus importante demeure le syndrome de Guillain-Barré (SGB), une maladie auto-immune inflammatoire du système nerveux périphérique aussi appelée polynévropathie aigüe inflammatoire démyélinisante. Jusqu'à 30% des patients atteints de SGB ont un historique d'infection récente à *C. jejuni*. Le risque de développer un SGB suite à cette infection demeure faible malgré tout (moins d'un cas sur 1000) (Allos, 1997). Par contre certains sérotypes de *Campylobacter* augmentent ce risque. La maladie est associée avec de la faiblesse, voire de la paralysie, des gonflements ou une démarche bancale. Des cas extrêmes présentent des difficultés à respirer, une tension artérielle anormale, etc. Dans la majorité des cas, les symptômes se dissipent après quelques semaines à quelques mois. À l'opposé, certains gardent des séquelles permanentes. Ces manifestations sont causées par le système immunitaire du patient qui attaque les nerfs pour endommager la gaine de

myéline ce qui cause une transmission de signaux nerveux ralentie ou modifiée (Hadden et *al.*, 1998). L'association entre campylobactériose et SGB n'est pas bien connue mais on a observé des analogies entre le LPS de *C. jejuni* et certains gangliosides du système nerveux (Altekurse et *al.*, 1999).

Le premier séquençage d'un génome complet de *C. jejuni* a été effectué en 2000 (souche NTCTC11168) (Parkhill et *al.*, 2000). Depuis, au moins quatre autres génomes de *C. jejuni* (RM1221, 81-176, 81116 et ICDCC07001) ont été séquencés. Des études ont été faites sur différents gènes mais en vérité, le chromosome circulaire de 1 641 481 pb reste largement à étudier. Ainsi, beaucoup de pistes de mécanismes sont suggérées par des analyses *in silico* mais des expériences en laboratoire ne sont pas encore venues confirmer les hypothèses sur les fonctions d'un grand nombre de gènes. Il faut mentionner que le type respiratoire particulier de *C. jejuni*, ses caractéristiques physiologiques et son pouvoir pathogène en font une bactérie plus difficile à manipuler que d'autres.

Pour ce qui est du système de recombinaison site-spécifique on soupçonnait qu'un système pouvait exister chez les protéobactéries car elles possèdent un chromosome circulaire mais on n'en avait aucune preuve. Or, en 2009, on a caractérisé *in silico* de manière extensive le système *dif*/Xer chez cet embranchement (Carnoy et Roten, 2009). La plupart (87,7%) des 234 chromosomes de 156 bactéries analysées codaient pour des recombinases XerC et XerD-like et des sites *dif-like* mais on a remarqué que le système «classique» n'était pas trouvé chez un sous-groupe d' ϵ -protéobactéries pathogènes incluant

Helicobacter sp et *Campylobacter* sp qui semblaient avoir un système différent. Une comparaison avec le système de recombinaison des streptocoques et des lactocoques qui fonctionnent avec une seule recombinase (XerS) et un site *dif* (*dif_{SL}*) atypique a révélé la présence d'un tout nouveau système de recombinaison *dif*/Xer phylognétiquement distinct (figure 17) dont la seule recombinase présente est nouvelle (XerH) et dont le site *dif* (*dif_H*) partage un peu d'homologie avec *dif_{SL}*.

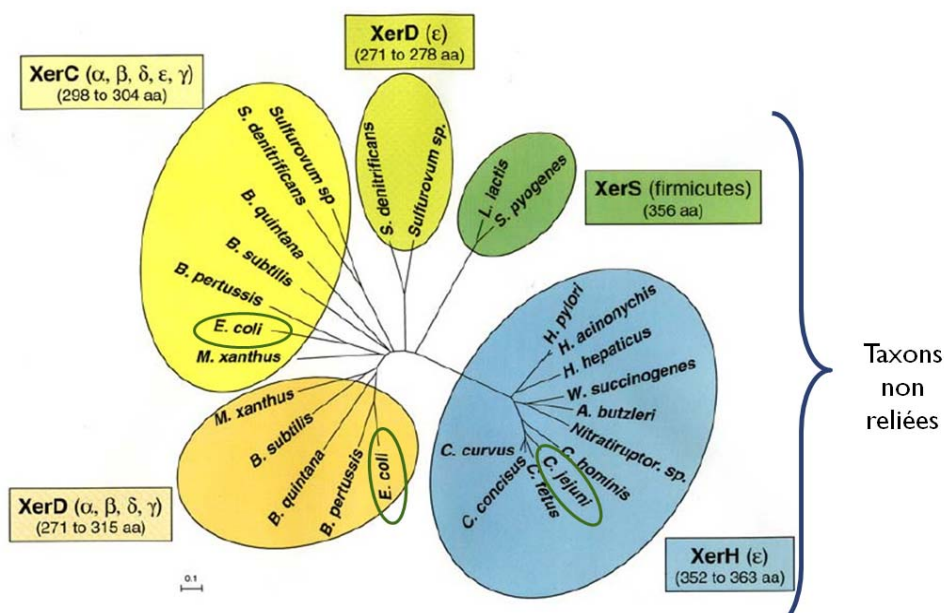


Figure 17. Analyse phylogénétique des recombinases XerC, XerD, XerS et XerH. Des XerH du sous-groupe ϵ sont comparées avec des XerC et XerD d'autres espèces ϵ mais aussi d'autres taxons tels que α , β , δ et γ . Les recombinases XerS de *Streptococcus pyogenes* et de *Lactococcus lactis* ont été ajoutées pour comparaison. La phylogénie a été bâtie en utilisant la méthode «Neighbor-Joining» (Saitou et Nei, 1987). L'alignement des séquences d'aa (avec ClustalW) et les analyses phylogénétiques ont été réalisés dans MEGA4 (Tamura et al., 2007). Les distances évolutives ont été calculées avec la méthode de correction Poisson. L'éventail de taille des recombinases est entre parenthèses (D'après Carnoy et Roten, 2009).

Phylogénétiquement, le système *dif*/XerH semble avoir évolué singulièrement ce qui en fait un système qu'on ne peut pas l'assimiler aux autres déjà caractérisé *in vitro*. XerH est néanmoins plus proche de XerD que de XerC. XerS, même si elle fait aussi partie d'un système à une seule recombinaison, n'a pas évolué avec XerH.

4. Projet de Maîtrise

Un grand nombre d' ϵ -protéobactéries montre un système *dif*/Xer putatif inédit. Les quelques recherches *in silico* menées sur ce système inattendu ont écrit les premières pages d'un tout nouveau chapitre de la recombinaison site-spécifique. Aucune expérience *in vitro* ou *in vivo* n'avait été effectuée pour comprendre ce système. Nous avons décidé de l'étudier chez *Campylobacter jejuni*, un représentant majeur de ce sous-groupe de protéobactéries. Cette bactérie pathogène alimentaire importante constitue un organisme intéressant sur lequel étudier la recombinaison site-spécifique de type Xer de par sa morphologie particulière et de par son impact médical.

Notre hypothèse est que *Campylobacter jejuni* possède un système de recombinaison *dif*/Xer composé d'une seule recombinaison (XerH) qui se lie au site *dif_H* pour procéder à une recombinaison site-spécifique qui assure une ségrégation normale des chromosomes dans les cellules filles et ce, de manière similaire à XerS et *dif_{SL}* chez les streptocoques et les lactocoques.

Nous avons utilisé des procédures de clonage, de surexpression, de purification et d'interaction *in vitro* pour caractériser ce nouveau système de recombinaison. Nous avons voulu cloner le site de recombinaison et la

recombinase avec différents plasmides dans *E. coli*. Nous avons également voulu étudier la spécificité de ce système en testant sa recombinase sur le site *dif_{SL}* à l'aide d'expériences de retard sur gel.

Dans un contexte de multi-résistance aux antibiotiques chez un nombre de plus en plus important de microorganismes pathogènes, évaluer l'importance du système de recombinaison *Xer/dif* chez *Campylobacter jejuni* pour la croissance bactérienne pourrait mener à une approche alternative pour mieux lutter contre les infections causées par certaines ϵ -protéobactéries.

Chapter II

Article

The *dif*Xer site-specific recombination system of *Campylobacter jejuni*

Keywords: site-specific recombination , *dif_H*, *Campylobacter jejuni* XerH, tyrosine recombinaise

Zoulikha Rezoug and George Szatmari*

Université de Montréal, Faculté de Médecine

Département de microbiologie et immunologie,

Montréal, Québec, Canada

*Address for correspondence

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

Phone: 1(514) 343-5767

Fax: 1(514) 343-5701

Abbreviations: aa: amino acids; bp: base pair(s); EDTA: ethylene diamine tetraacetate; LB: Luria-Bertani; 6X His tag : 6 histidine tag; SDS: sodium dodecyl sulfate; TBE: tris-borate-EDTA buffer; V: volts; bp : base pair; kDa : kilodalton

Abstract

The dimerization of bacterial plasmids or chromosomes is a common event in bacteria. Chromosome and plasmid dimers prevent genome segregation in daughter cells which hinders cell division. The *dif*/Xer site-specific recombination system resolves these dimers into monomers. The classical system uses two tyrosine recombinases, XerC and XerD to perform the recombination reaction at the *dif* site which consists of 28 to 30 bp. However, single Xer recombinase systems have been recently discovered. XerS, found in Streptococci and Lactococci is capable of completing the monomerisation reaction by acting at an atypical *dif* site called *dif_{SL}* (31 bp).

Campylobacter jejuni a Gram-negative microaerophilic pathogen, known to be the most common cause for gastroenteritis, harbours a circular chromosome just like the other members of its class: ϵ -proteobacteria. Thus, it is expected to hold a dimer resolution system. *In silico* tests showed that a subgroup of ϵ -proteobacteria including *Campylobacter* sp and *Helicobacter* sp had a phylogenetically distinct *dif*/Xer recombination system with apparently only one recombinase and an atypical *dif* motif. Here, we investigate this novel recombination system in *Campylobacter jejuni* by comparison to other *dif*/Xer systems, by cloning and by characterizing its recombinase (designated XerH) and its interaction with *dif_{SL}*.

1. Introduction

A large number of bacteria and archaea possess a circular chromosome that, during DNA replication, happens to form concatenated replicons because of crossovers during homologous recombination (Sherratt 2003; Lesterlin et al., 2004; Carnoy and Roten 2009; Cortez et al., 2010 and Duggin et al., 2011). This event occurs in 10 to 15% of bacteria and requires resolution of the dimeric chromosomes by a conserved machinery, known as the *dif*/Xer site specific recombination system, to achieve an efficient genome segregation partition and cell division. This system usually comprises two tyrosine recombinases, XerC and XerD (37% amino acid identity), that act in concert at a recombination site, *dif* (Deletion Induced Filamentation), located in the replication terminus. Each recombinase binds to their respective specific 11-bp sequences that flank a central region, the spacer, usually 6-bp in chromosomal *dif* sites and 8-bp in plasmidic *cer* sites (Blakely et al., 1991; Blakely et al., 1993 and Sherratt 2003). An important cell division protein, FtsK, spatially regulates the recombination process by its N-terminal domain that localizes it to the septum and by its C-terminal domain that permits translocation of the DNA to the septum by recognizing polarized sequences (KOPS) directing it to the *dif* site. This allows recombination to occur only in the septum (Sivanathan et al., 2006 and 2009).

The *dif*/Xer system has been widely studied in *Escherichia coli* where its mechanism has been characterized and the interactions between XerC and XerD and with the *dif* site were both structurally and biochemically addressed (Lesterlin et al., 2004; Sherratt et al., 2007 and Bigot et al., 2007). Nevertheless, most

tyrosine recombinase systems work with only one recombinase (e. g. *Cre/loxP* from plasmid P1 (Grindley et al., 2006)).

Xer recombinases are typically identified by their RHR_Y tetrad. These residues are conserved among tyrosine recombinases. The three first residues (RHR) are known to hold a central role in the activation of the phosphodiester bond that allows DNA cleavage by the adjacent tyrosine residue. In the absence of a partner or DNA, the conformation of the recombinase changes so that the catalytic residue is hidden and therefore inactive, to prevent random cleavage (Aussel et al., 2002). In Xer recombination, XerC and XerD act in a cooperative manner. First, two copies of each recombinase bind to their respective sequence on the *dif* site of each chromosome to form a synaptic complex. Then, one pair of recombinases catalyses cleavage of the first pair of stands and performs strand exchange. This results into a recombination intermediate known as the Holliday junction. Then, an isomerization of the intermediate prevents the reversibility of the first strand exchange. Finally, the second pair of recombinases catalyses the cleavage and the exchange of the second pair of strands which resolves the Holliday junction and produces the chromosome monomers ready to be segregated in each daughter cell (Hallet and Sherratt 1997).

XerD and XerC homologs are being discovered in more and more microorganisms, sometimes being part of a system that performs Xer recombination in a different way, demonstrating that the evolution of the system has occurred throughout a long period of time (Recchia and Sherratt 1999; Carnoy and Roten 2009; Cortez et al., 2010 and Duggin et al., 2011). Recent

studies brought to light a single recombinase system in *Streptococci* sp and *Lactococci* sp, a family of firmicutes, designated as XerS/*dif_{SL}* (Le Bourgeois et al., 2007). Surprisingly, this system was shown to be functional in *E.coli*, even though the FtsK proteins from these species differ (Le Bourgeois et al., 2007). This contradicts the concept of high specificity in the control of the Xer system in *E. coli* that was thought to require specific interactions between the components of the complex. Nolivos et al., (2010) were the first to thoroughly study the XerS/*dif_{SL}* system in *Lactococcus lactis*. They showed that XerS binds and performs cleavage on *dif_{SL}* *in vitro*, that binding and strand exchange are asymmetric and that FtsK-dependant coupling of chromosome segregation with cell division is conserved in the FtsK/Xer system. Recent studies on this system in a related bacteria showed that a defective XerS/*dif_{SL}* system yields abnormal morphology of cell chains in *S. suis* (chains 10-30 cells long instead of 5-10 cells) but most surprisingly, showed that *dif_{SL}* has a 11-bp spacer region, instead of the 6-8-bp found in other Xer systems (Leroux et al., 2011).

Nevertheless, the XerS/*dif_{SL}* system is the sole bacterial single Xer recombinase system characterized to date. Recent studies achieved *in silico* reported that a subgroup of ϵ -proteobacteria also possessed a single tyrosine recombinase system phylogenetically distant from *dif_{SL}*/XerS and even more divergent than *dif*/XerCD. This suggests that the acquisition of site-specific recombination systems occurred many times during evolution (Carnoy and Roten 2009). The search for a *dif* site and a recombinase in this subgroup has been complicated since the BLAST of the genomes using an *E. coli dif* sequence did

not give any homologous sites. It was only after performing BLAST analysis using XerC and XerD of *E. coli* and finding a protein having a low degree of similarity with XerD but none with XerC that it became clear there was an atypical *dif* site in that subgroup. Then, after performing BLAST analysis with *dif_{SL}* on the ϵ subgroup, a similar protein presenting the important features of *dif* was discovered. The novel recombinase and *dif* site were designated as XerH and *dif_H*, the H being for *Helicobacter* which is a major representative of the ϵ subgroup. *Campylobacter jejuni*, a Gram negative microaerophilic curved rod shaped bacteria, is also an important member of this sub-group and is widely known as the main cause for human gastroenteritis (Allos 2001 and Ruiz-Palacios 2007). *C. jejuni*'s impact on public health made us focus our research on its Xer system. Here, we study for the first time this second single Xer recombinase system. We demonstrate that the putative Xer recombinase and *dif* site of *Campylobacter jejuni* can perform binding with each other and that XerH can bind to *dif_{SL}* of *Streptococcus suis*.

2. Materials and Methods

2.1 Strains and plasmids

The strain of *Campylobacter jejuni* RM1221 used to clone the putative *dif_H* and *xerH* genes was a hospital isolate provided by the university collection. The *Streptococcus suis* strain used was S735 of serotype 2 (Maxime Leroux, personal communication). *Escherichia coli* strain T7 express (New England Biolabs) *lysY* (*miniF-lysY* (*Cam^R*) / *fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet^S) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 [miniF-lysY (*Cam^R*)]*) was used for cloning and overexpression of XerH. For overexpression of MBP-fused XerS, strain DS9029 (*AB1157 recF lacI^q lacZΔM15 xerD::TpR xerC::miniMu PR13*) (Colloms et al., 1996) was used. *E. coli* strain Turbo F' *proA⁺B⁺ lacI^q ΔlacZM15/fhuA2 Δ(lac-proAB) glnV gal R(zgb-210::Tn10)Tet^S endA1 thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5* (New England Biolabs) was used for cloning and for purification of plasmids containing *dif_H* and *dif_{SL}*.

The *xerH* gene was amplified by PCR and cloned into plasmid pQE30 (Qiagen) to be introduced by routine plasmid transformation into T7 express cells and overexpressed as an N-terminal 6xHis-tagged protein. XerH was purified under native conditions on Ni-NTA columns (Qiagen). The putative *dif_H* region was amplified and cloned into plasmid pTZ-PC (Daniel Tessier, personal communication). The *xerS* gene was amplified and cloned in plasmid pMALC2 (NEB) and the *dif_{SL}* site was cloned in pUC19 (NEB).

2.2 Growth conditions and DNA manipulations

Escherichia coli strains were grown in Luria-Bertani (LB) broth and plated on LB agar supplemented with the appropriate antibiotics when needed. Concentrations used were 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of ampicillin and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of kanamycin. For protein production, cells were grown in autoinducible medium (4.76% Terrific Broth, 0.4% Glycerol, 0.2% Lactose monohydrate, 0.05% Glucose, and 2mM MgSO_4) (Studier, 2005). *Campylobacter jejuni* was plated on blood agar and incubated in microaerophilic (10% CO_2 , 5% Oxygen) conditions at 42°C and grown in TSB (Tryptic Soy Broth) without antibiotics. *Streptococcus suis* was grown as described in Leroux et al., 2011.. Restriction enzymes, Taq DNA polymerase, Phusion DNA polymerase, Vent DNA polymerase, T4 polynucleotide kinase, Antarctic phosphatase and T4 DNA ligase were all purchased from New England Biolabs (NEB) and used following the supplier's instructions. All routine DNA manipulations were performed as described in Jouan and Szatmari (2003). DNA fragments were extracted from agarose gels using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen) and were purified by using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen). Genomic DNA of *S. suis* and *C. jejuni* was extracted using the DNeasy Tissue Kit (Qiagen). Plasmids were extracted using the QIAquick miniprep kit.

2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR) conditions

Amplification reactions were performed with a Labnet MultiGene™ Gradient PCR Thermal Cycler (Mandel Scientific) with High Fidelity Phusion DNA polymerase (NEB) or Taq DNA polymerase (NEB) according to the supplier's conditions. The cycling conditions for amplification of *C. jejuni*'s *dif_H* site region were: 95°C/1 min followed by 30 cycles of 95°C/15s, 57°C/30s and 72°C/30s, ending with a final extension at 75°C/5 min. The total volume for the reaction was 100 µl with *C. jejuni*'s genomic DNA as template and Phusion DNA polymerase. The primers used were *cjdif_H*-Forward GAGCAAATTAAGTTC TGCT and *cjdif_H*-Reverse TTCACTCAAAGGTAAAAT. The region was cloned in the XcmI site of pTZ-PC (Daniel Tessier personal communication).

The *S. suis dif_{SL}* region was amplified with primers Dif-SL-F (TTCCAGTTTTGTCGTTATTAAAGTAC) and Dif-SL-R (TTTCTTTTAGTTG ATCAATTTTTTCC) and cloned as described in Leroux et al., (2011). The half sites were also synthesized as described in Leroux et al., (2011). DNA-binding substrates for mobility shift assays were amplified by Taq DNA polymerase using primers M13F (CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC) and the 5' HEX-labelled M13R (AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA) universal sequencing primers. Suicides substrates were 3' FITC labeled and prepared as described in Leroux et al., 2011 and Blakely et al., 1997.

The *C. jejuni xerH* gene was amplified with primers CjXerH-F (CGG GATCCATGAAATACCCTTTAGATTGTGAAG) and CjXerH-R (CGCTGC AGTCAAGAGTCACTTAATTCCTTTG) with the following conditions: 98°C/1 min followed by 98°C/15s, 61°C/30s and 72°C/3 min for 30 cycles, with an

ultimate extension at 72°C/5 min using High-Fidelity Phusion DNA polymerase and *C. jejuni*'s genomic DNA in a total volume of 100 µl. Amplicons were purified and digested with restriction enzymes BamH1 and Pst1 (NEB) and cloned into pQE30 (previously digested with the same enzymes). Once ligated, the plasmid pQEXerH was transformed into T7 express cells.

All cloned PCR products were verified by sequencing at the IRIC genomic facility of the Université de Montréal.

2.4 Protein Overexpression

The XerH protein was expressed as an N-terminal 6X- His fusion using the pQEXerH clone introduced in T7 express cells. After an overnight growth, 1 ml of a 5 ml LB broth culture of these cells was used to inoculate 100 ml of autoinducible medium supplemented with MgSO₄ and ampicillin (Studier 2005). After 16-18 hours growth at 37°C, the cells were harvested and resuspended in lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole pH8.0). Lysozyme was added to 1 mg/ml and the solution was incubated on ice for 30 min before sonication. The lysate was then centrifuged at 10 000 x g for 20 to 30 min at 4 °C. The supernatant was collected and mixed with Ni-NTA slurry and loaded into columns after which 8 column volumes of wash buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole pH 8.0) and 4 column volumes of elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole pH8.0) were passed.

The XerS protein was expressed as an MBP fusion using the pMalC2 clone introduced in *E. coli* DS9029. Autoinducible media was inoculated as described above. After a 16-18 hours growth at 37°C, the cells were harvested and resuspended in TM buffer (10 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM MgCl₂). After an addition of NaCl (final concentration of 200 mM), the solution was put through two to five freeze-thaw cycles after which complete Mini protease inhibitor cocktail tablets, EDTA-free (Roche Diagnostics) were added. The solutions were sonicated and centrifuged at 13, 000 x g at 4 °C. The supernatants were collected and passed through amylose columns or on MBP-trap columns (GE Healthcare) following the manufacturer's protocols to obtain over 80% pure elutes as estimated from Coomassie-stained SDS-PAGE gels.

Protein concentrations were estimated by the Nano-drop spectrophotometer (Thermo Scientific). Protein purity and overexpression were detected by SDS-PAGE on 14.5% gels and visualized by Coomassie blue staining.

2.5 DNA-binding assays

Specific DNA binding was determined by a gel retardation assay (Jouan and Szatmari, 2003) using specific DNA fragments labelled fluorescently at the 5' end with 6-HEX by PCR. The primers used were M13F-40PCR and M13R-48HEX5'. Reaction conditions consisted of 4 ng HEX-labelled *dif* sites, TENg-binding buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl, and 5% glycerol), 1 µg polyIdC (average mol. Wt. 20 000 bp (Roche)) in increasing

XerH, and XerS concentrations. Each reaction had a total volume of 20 μ L and was incubated for 30 min at 37 °C and 42 °C before loading on a 5% polyacrylamide gel at 4 °C in 0.5X TBE buffer. After electrophoresis, detection was carried out with a Typhoon Trio Imager and analysed using ImageQuant software (GE Healthcare).

For the analysis of the formation of covalently linked Xer-*dif* complexes, 98ng of the 3'FITC-labelled TN or BN suicide substrates were incubated in a 20 μ l total volume containing TDMNG buffer (50 mM Tris pH 7.5, 5 mM DTT, 75 mM MgCl₂, 25 mM NaCl and 25% glycerol) in the presence of different amounts of XerH and XerS, each in the presence of 1 μ g poly dI-dC. After a 60 min incubation at 37 °C, reactions were stopped with 5 μ l of 2% SDS and 5 μ l of Orange loading dye (NEB), incubated at 100°C for 10 min and then electrophoresed in a 6% TBE gel in the presence of 0.1% SDS (Leroux et al., 2011). Detection was carried as described above.

2.6 *In silico* comparisons

Sequences were obtained from Biocyc.org and compared using ClustalW tool available at <http://www.genome.jp> (Larkin et al., 2007) and the identity percentage was obtained by LALIGN global method alignment available at <http://www.ch.embnet.org>.

3. Results and discussion

Among the sub-group of ϵ -proteobacteria identified *in silico* as harbouring a single recombinase *dif*Xer system, we chose to focus particularly on *Campylobacter jejuni*'s system. In this work, we report the first *in vitro* studies ever made on this system.

3.1 Cloning Overexpression and Purification of XerH

We sought to clone XerH as a 6xHis tagged protein. The steps of PCRs, cloning, expression in *E. coli* and purification did not need any major modifications and the protein was isolated well. The gene was isolated by PCR and cloned into pQE30 (Ampicillin resistant) that has its own promoter. After transformation into T7 express competent cells, overexpression was carried out in auto-inducible broth. Purification as a 6xHis tagged protein showed that XerH was soluble and 80 % pure. The purified protein had a size of 41 kDa as predicted and was best purified on Ni-NTA spin columns eluted with 250 mM Imidazole.

3.2 Analysis of *dif_H* compared to *dif_{SL}*

The *dif_H* site, when discovered in *Campylobacter jejuni* and other ϵ -proteobacteria, was analyzed and aligned with *dif_{SL}* as a conventional site (Carnoy et Roten 2009). However, the recent demonstration that *dif_{SL}* has an 11-bp spacer changed the conception of the Xer recombination site as it was known (Leroux et al., 2011). In light of this discovery, it was necessary to review the distribution in the putative *dif* site of the ϵ -proteobacteria single recombinase systems. We did so

by aligning *dif_H* with *dif_{SL}* in accordance with the splits between the three regions of the sequence that Leroux et al., suggested (Figure 1). It is known that nucleotides surrounding the middle of *dif_{SL}* are more conserved in the XerS systems. Thus, these nucleotides may be critical for cleavage and strand exchange (Le Bourgeois et al., 2007; Nolivos et al., 2010; Leroux et al., 2011). The consensus sequence of *dif_{SL}* and *dif_H* sites shows that identity is stronger at the border between the spacer and the binding sites (Figure 1). Furthermore, the binding sites in *dif_{SL}* are asymmetric since the left binding site is two nucleotides longer than the right binding site (Nolivos et al., 2010; Leroux et al., 2011). The consensus sequence of *dif_{SL}* and *dif_H* shows identity in the second and third nucleotide of the left binding site (Figure 1). These observations allow us to make a few predictions about the structure of *dif_H*. First, the spacer of ϵ -proteobacteria single recombinase systems would be 11-bp long. Second, the left binding site is at least 10-bp long; more likely 11-bp. Third, the asymmetry created between the binding sites might promote binding to the left site in priority, obliging the binding to the right site to only occur with the help of a monomer just as shown with *dif_{SL}* (Nolivos et al., 2010; Leroux et al., 2011).

3.3 DNA binding activity of XerH to *dif_{SL}*

Based on the strong homologies between *dif_{SL}* and *dif_H*, and since no suitable *dif_H* substrate was available at the time of this study, binding of XerH to *dif_{SL}* was performed to see how versatile XerH was to bind different

recombination sites. The XerH of an important representative of the pathogen ϵ -proteobacteria, *Campylobacter jejuni*, was overexpressed and purified. It was expressed as a 6x-His tagged protein to be used in binding assays with *dif_{SL}* of *S. suis*. The recombination site was amplified and 5'Hex-labelled by PCR. A constant amount of labelled DNA was incubated at 37 °C with a gradient of XerH as described in Materials and Methods (Figure 2). To avoid non-specific interactions, poly dI-dC was added to each reaction in 1000-fold molar excess. Binding was detected at 1.9 μ g (well 4) and higher amounts of XerH at a quantity of 7.7 μ g of XerH two retarded bands were observed, with the slower migrating retarded fragment representing two recombinases bound to the *dif* site and the faster migrating retarded fragment representing one recombinase bound to one side of the site. It is important to mention that the amount of unbound DNA (fastest migrating band) is about half of the total quantity of labelled DNA added to the reaction. This means that a significant amount of protein has not been able to bind the site. The same assays were performed with reactions incubated at 42°C (the optimal temperature for *C. jejuni*'s growth) and similar patterns of DNA binding were observed (data not shown).

These results show that the putative recombinase of *Campylobacter jejuni* is capable of recognizing a similar recombination site and bind it specifically. However, the binding seems weak for that a significant amount of DNA remained unbound compared to the binding of XerS. *C. jejuni* grows efficiently in human hosts (37°C) and in avian hosts (42°C) (its normal reservoir)

which explains why there is no difference between the reactions carried at those two temperatures.

3.4 Non-cooperative binding

When the results of the binding were compared to that of XerS to *dif_{SL}* in the same conditions, important differences could be noticed (figure 2 wells 7 and 8). First, XerS/*dif_{SL}* wells displayed more slower migrating complexes than what has been observed with XerH/*dif_{SL}*. This is due to the fact that XerS was overexpressed and purified as a maltose-binding protein fusion which results in an increased molecular mass of the protein, which is reflected in higher retarded bands in these assays. However, it has been proven that the N-terminal MBP moiety does not affect Xer binding (Blakely et al., 1997, 2000; Neilson et al., 1999; Villion and Szatmari 2003). Also, for the highest amount of XerS (10 µg), no free DNA was observed and for the lower amount of XerS (5 µg), only a small quantity of DNA did not shift. The slowest migrating fragments correspond to complexes where more than one XerS protomer is bound to the site (Leroux et al., 2011). A third complex was observed in both wells where XerS was added. It could be caused by non-specific binding or the presence of two *dif* sites in the complex. Also, XerS is known to perform cooperative binding when bound to *dif_{SL}* (Leroux et al., 2011) but Fig. 2 shows that XerH does not.

3.5 Binding of XerH to *dif_{SL}* half sites

To further characterize the binding of XerH to the *dif_{SL}* site, we performed retardation essays using 6Hex-labeled DNA substrates lacking the left half or the

right half of *dif_{SL}* which were constructed by site-directed mutagenesis (Fig 3). These half sites were both used at concentration of 4 ng/μl and the amounts of XerH varied as shown in the figure 3. Poly dI-dC was added to a 1000-fold excess in the reactions. Overall, the binding was very weak for XerH compared to that of XerS and it is uncertain if the pale bands seen in well 4 (1.9μg) of fig 4a and fig 4b were actual shifts or simply artefacts. However, the binding is significant compared with the no protein control on higher concentration wells (2 and 3, 6 and 7). Despite the inefficient binding, the right half site forms more retarded complexes than the left half site. However, the right site forms more complexes with XerH than the left half site. The XerS control (well 5 and 9) doesn't bind the half sites as efficiently as the complete site since there is a considerable amount of DNA that remains unbound. As shown in figure 3B, the left half site sequence has 9-bp conserved with *dif_H* while the right half site sequence has 6-bp conserved with *dif_H*. Based on what was observed with XerS binding *dif_{SL}*, we would have expected a better binding to the left half site but it's the opposite that was observed. In fact, for XerS binding to *dif_{SL}*, a monomer of the recombinase is believed to bind the left part of *dif_{SL}* and then recruits another monomer that binds the right part. This cooperative binding has not been observed with XerH. The contradiction between the expected binding strength of XerH to the half sites and what was actually observed might mean that the sequence specificity of XerH allows a better binding to the complete *dif_{SL}* site not only because of the consensus sequence with *cjdif_H* but also because of the structure of the DNA. It is known that non-specific sequences adjacent to the recombination site are

recognized by recombinases (Nolivos *et al.*, 2010). This recognition outside of the site is due to non-specific binding, knowing that the *dif* region is typically A+T rich. Thus, the weaker binding of XerH to *dif_{SL}* half sites might express the importance of the conformation of the protein for the affinity with the *dif* region. The conformation of XerH for binding might be similar enough to XerS to bind specifically but not strongly. Furthermore, the absence of a cooperative binding between monomers of XerH upon *dif_{SL}* binding can explain the difficulty to bind either half of the site, since cooperation is known to play a big part in XerS-*dif_{SL}* complex formation. However, may it be on the full *dif_{SL}* site or its half sites, the binding of XerH remains weaker than XerS.

3.6 Activity of XerH on *dif_{SL}* suicide substrates

To assess the capacity of XerH to form covalent complexes with *dif_{SL}*, we used suicide substrates which consist of a nick introduced in the middle of site either on the top (TN) or on the bottom strand (BN) (Fig. 4b). These nicked strands ‘trap’ recombination intermediates after the cleavage induced by the recombinase. The cleavage next to the nick made in the middle of the sequence generates a short fragment that leaves the site incomplete and thus unable to religate DNA. This leaves a phosphotyrosine-linked intermediate that can be detected, therefore indirectly demonstrating a cleavage reaction. We show in figure 4 reactions made in the same conditions for XerH and XerS on these nicked strands. In reactions with XerS (positive control) (well 4 and 8), covalent complexes were detected with a preference for the bottom-nicked substrate as described by Leroux *et al.*, 2011. For reactions with XerH, no complexes were

detected. This negative result is not surprising since *dif_H/dif_{SL}* homology is very much hindered in suicide substrate reactions. Considering the observations made on *dif_{SL}* half sites and on the whole site that showed limited binding, the possibility for a cleavage to occur is also diminished. However, these negative results can only be confirmed when covalent complexes will be detected in XerH/*dif_H* reactions using specific suicide substrates and conditions. Then, the optimal reaction conditions can be used on *dif_{SL}* suicide substrates and if the retardation remains the same, the observations made here can be confirmed. Also, the amounts of protein added in the reactions would have to be much higher in the future in order to ‘flood’ the reaction with recombinase. In fact, a binding efficiency of around 90% is required to have a cleavage reaction (Blakely *et al.*, 1996). Then, a negative result would definitely exclude the possibility of a cleavage by XerH.

3.7 Comparison of cjFtsK to ssFtsK

The role of FtsK has been better understood in the Single recombinase systems recently, highlighting the importance of the translocation motor of the γ sub-domain in recombination activation which is not the case in other XerCD systems (Nolivos *et al.*, 2010). The comparison of *C. jejuni*'s FtsK's amino acid sequence with that of *S. suis* demonstrates a significant degree of similarity. At first glance, cjFtsK (946 aa) is larger than ssFtsK (789aa). With a ClustalW2 alignment (Figure 5) it is revealed that most of the additional nucleotides of cjFtsK are located in the N-terminal region. The two proteins display 30.1% identity according to the global alignment lead by a method described by Myers

and Miller (1989). Nearly two thirds of this identity is found in the C-terminal region that includes the three sub-domains important for recombination preparation and activation (α , β and γ). These observations suggest that the mechanism of Xer recombination activation of cjFtsK is similar to that of ssFtsK. This means that the translocation motor of cjFtsK would be necessary for efficient XerH /*dif_H* recombination (Nolivos et al., 2010). The N-terminal region of FtsK does not participate in Xer recombination activation but it is known to be a membrane-spanning domain that anchors the protein to the cell (Steiner et al., 1999; Dorazi and Dewar 2000; Aussel et al., 2002 and Crozat et al., 2010). Knowing that *S. suis* is a gram positive, coccus bacterium, the presence of a large FtsK N-terminus region might not be required to complete anchorage while *C. jejnui*, a gram negative, spiral shaped bacterium, would perhaps need longer transmembrane domains to anchor efficiently within the membrane. Nevertheless, these observations need to be verified extensively by *in vitro* and *in vivo* experiments in the future.

Several experiments are yet to be done on the XerH /*dif_H* recombination system that only starts to reveals its mechanism. The cleavage activity of XerH, its interaction mode with FtsK and its binding to *dif_H* must be determined. Further investigation is also bound to the discoveries that will be made on XerS/*dif_{SL}*. In fact, comparison between both systems constitutes the best way to understand their evolution and their mechanisms.

4. Acknowledgments

This work was supported by an operating grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Faculté des études supérieures et post-doctorales de l'Université de Montréal. We thank Maxime Leroux for his help and advice with *S. suis* manipulations.

5. References

Allos, B. M. "Campylobacter jejuni Infections: Update on Emerging Issues and Trends." *Clin Infect Dis* 32, no. 8 (2001): 1201-6.

Aussel, L., F. X. Barre, M. Aroyo, A. Stasiak, A. Z. Stasiak, and D. Sherratt. "FtsK Is a DNA Motor Protein That Activates Chromosome Dimer Resolution by Switching the Catalytic State of the XerC and XerD Recombinases." *Cell* 108, no. 2 (2002): 195-205.

Blakely, G., S. Colloms, G. May, M. Burke, and D. Sherratt. "Escherichia coli XerC Recombinase Is Required for Chromosomal Segregation at Cell Division." *New Biol* 3, no. 8 (1991): 789-98.

Blakely, G., G. May, R. McCulloch, L. K. Arciszewska, M. Burke, S. T. Lovett, and D. J. Sherratt. "Two Related Recombinases Are Required for Site-Specific Recombination at *dif* and *cer* in *E. Coli* K12." *Cell* 75, no. 2 (1993): 351-61.

Blakely, G. W., A. O. Davidson, and D. J. Sherratt. "Binding and Cleavage of Nicked Substrates by Site-Specific Recombinases XerC and XerD." *J Mol Biol* 265, no. 1 (1997): 30-9.

Blakely, G.W., A. O. Davidson, and D. J. Sherratt. "Sequential Strand Exchange by XerC and XerD During Site-Specific Recombination at *dif*." *J Biol Chem* 275, no. 14 (2000): 9930-6.

Carnoy, C., and C. A. Roten. "The *dif*/Xer Recombination Systems in Proteobacteria." *PLoS One* 4, no. 9 (2009): e6531.

Colloms, S. D., R. McCulloch, K. Grant, L. Neilson, and D. J. Sherratt. "Xer-Mediated Site-Specific Recombination in Vitro." *EMBO J* 15, no. 5 (1996): 1172-81.

Cortez, D., S. Quevillon-Cheruel, S. Gribaldo, N. Desnoues, G. Sezonov, P. Forterre, and M. C. Serre. "Evidence for a Xer/*dif* System for Chromosome Resolution in Archaea." *PLoS Genet* 6, no. 10 (2010): e1001166.

Crozat, E., and I. Grainge. "FtsK DNA Translocase: The Fast Motor That Knows Where It's Going." *Chembiochem* 11, no. 16 (2010): 2232-43.

Crozat, E., A. Meglio, J. F. Allemand, C. E. Chivers, M. Howarth, C. Venien-Bryan, I. Grainge, and D. J. Sherratt. "Separating Speed and Ability to Displace Roadblocks During DNA Translocation by FtsK." *EMBO J* 29, no. 8 (2010): 1423-33.

Dorazi, R., and S. J. Dewar. "Membrane Topology of the N-Terminus of the *Escherichia coli* FtsK Division Protein." *FEBS Lett* 478, no. 1-2 (2000): 13-8.

Duggin, I. G., N. Dubarry, and S. D. Bell. "Replication Termination and Chromosome Dimer Resolution in the Archaeon *Sulfolobus Solfataricus*." *EMBO J* 30, no. 1 (2011): 145-53.

Grindley, N. D., K. L. Whiteson, and P. A. Rice. "Mechanisms of Site-Specific Recombination." *Annu Rev Biochem* 75, (2006): 567-605.

Hallet, B., and D. J. Sherratt. "Transposition and Site-Specific Recombination: Adapting DNA Cut-and-Paste Mechanisms to a Variety of Genetic Rearrangements." *FEMS Microbiol Rev* 21, no. 2 (1997): 157-78.

Jouan, L., and G. Szatmari. "Interactions of the *Caulobacter Crescentus* XerC and XerD Recombinases with the *E. Coli dif* Site." *FEMS Microbiol Lett* 222, no. 2 (2003): 257-62.

Leroux, M., F. Jia, and G. Szatmari. "Characterization of the *Streptococcus Suis* XerS Recombinase and Its Unconventional Cleavage of the *difsl* Site." *FEMS Microbiol Lett* 324, no. 2 (2011): 135-41.

Lesterlin, C., F. X. Barre, and F. Cornet. "Genetic Recombination and the Cell Cycle: What We Have Learned from Chromosome Dimers." *Mol Microbiol* 54, no. 5 (2004): 1151-60.

Myers, E. W., and W. Miller. "Approximate Matching of Regular Expressions." *Bull Math Biol* 51, no. 1 (1989): 5-37.

Neilson, L., G. Blakely, and D. J. Sherratt. "Site-Specific Recombination at *dif* by *Haemophilus Influenzae* XerC." *Mol Microbiol* 31, no. 3 (1999): 915-26.

Nolivos, S., C. Pages, P. Rousseau, P. Le Bourgeois, and F. Cornet. "Are Two Better Than One? Analysis of an FtsK/Xer Recombination System That Uses a Single Recombinase." *Nucleic Acids Res* 38, no. 19 (2010): 6477-89.

Recchia, G. D., and D. J. Sherratt. "Conservation of Xer Site-Specific Recombination Genes in Bacteria." *Mol Microbiol* 34, no. 5 (1999): 1146-8.

Ruiz-Palacios, G. M. "The Health Burden of *Campylobacter* Infection and the Impact of Antimicrobial Resistance: Playing Chicken." *Clin Infect Dis* 44, no. 5 (2007): 701-3.

Sherratt, D. J. "Bacterial Chromosome Dynamics." *Science* 301, no. 5634 (2003): 780-5.

Sivanathan, V., M. D. Allen, C. de Bekker, R. Baker, L. K. Arciszewska, S. M. Freund, M. Bycroft, J. Lowe, and D. J. Sherratt. "The FtsK Gamma Domain Directs Oriented DNA Translocation by Interacting with KOPS." *Nat Struct Mol Biol* 13, no. 11 (2006): 965-72.

Sivanathan, V., J. E. Emerson, C. Pages, F. Cornet, D. J. Sherratt, and L. K. Arciszewska. "KOPS-Guided DNA Translocation by FtsK Safeguards *Escherichia coli* Chromosome Segregation." *Mol Microbiol* 71, no. 4 (2009): 1031-42.

Steiner, W., G. Liu, W. D. Donachie, and P. Kuempel. "The Cytoplasmic Domain of FtsK Protein Is Required for Resolution of Chromosome Dimers." *Mol Microbiol* 31, no. 2 (1999): 579-83.

Studier, F. W. "Protein Production by Auto-Induction in High Density Shaking Cultures." *Protein Expr Purif* 41, no. 1 (2005): 207-34.

Villion, M., and G. Szatmari. "Cloning and Characterisation of the *Proteus Mirabilis* XerD Gene." *FEMS Microbiol Lett* 164, no. 1 (1998): 83-90.

Villion, M., and G. Szatmari. "The XerC Recombinase of *Proteus Mirabilis*: Characterization and Interaction with Other Tyrosine Recombinases." *FEMS Microbiol Lett* 226, no. 1 (2003): 65-71.

6. Figure Legends

Fig. 1. Alignment of *dif_{SL}* and *dif_H* sites with the consensus sequence.

Alignment is shown separately for each region of the sites according to the findings on *dif_{SL}*.

Fig. 2. Gel retardation analysis of the binding of cjXerH to the whole *ssdif_{SL}* site in comparison with ssXerS binding.

Samples were incubated at 37°C for 30 minutes as explained in Materials and Methods. A constant amount of 15 ng of PCR product was used and the amounts of protein are indicated above each well. The blue joined rectangles represent *dif_{SL}* while the pink ellipses represent the recombinases bound specifically.

Fig. 3. Gel retardation analysis of the binding of cjXerH to the right half and to the left half of *ssdif_{SL}* site in comparison with ssXerS binding.

A. Samples were incubated at 37°C for 30 minutes as explained in Materials and Methods. A constant amount of 15 ng of PCR product was used and the amounts of protein are indicated above each well. The blue joined rectangles represent the *dif_{SL}* half-sites while the pink ellipses represent the recombinases bound specifically.

B. The table displays the *C. jejuni* and *S. suis* site sequences and the consensus. The left half's sequence used in essays is colored in green while the right half's sequence used in essays is colored in red.

Fig. 4. Denaturing retardation gel of cjXerH activity on suicide substrates in comparison with ssXerS activity.

A. Samples were incubated at 37°C for 60 minutes and heated to 95 °C for 10 minutes before loading on a 5% polyacrylamide gel with 1% SDS in Tris-borate buffer as explained in Leroux *et al.*, 2011. A constant amount of 98 ng of PCR product was used and the amounts of protein are indicated above each well.

B. *ssdif_{SL}* sequence with the blue triangles showing where the nick was introduced for each strand. The circled nucleotides show the location of the 3' FITC labeling.

Fig. 5. Alignment of the amino acid sequence of cjFtsK and ssFtsK.

The alignment was obtained by using the ClustalW tool available at <http://www.genome.jp>. Stars (*) represent identity; double dots (:) represent a high degree of similarity while single dots (.) represent less similarity between amino acids.

7. Figures

Figure 1.

<i>Helicobacter pylori</i>	TTTAGTTATGA	AAACTGCACTT	TTCAAACCTT
<i>Campylobacter jejuni</i>	TTTTGTATTGA	AAACTGTAATT	TTCAAACCTT
<i>Streptococcus suis (difsL)</i>	ATTTTTCCGAA	AAACTATAATT	TTCTTGAAA
Consensus sequence	-TT--T----A	AAACT--A-TT	TTC-----

Figure 2.

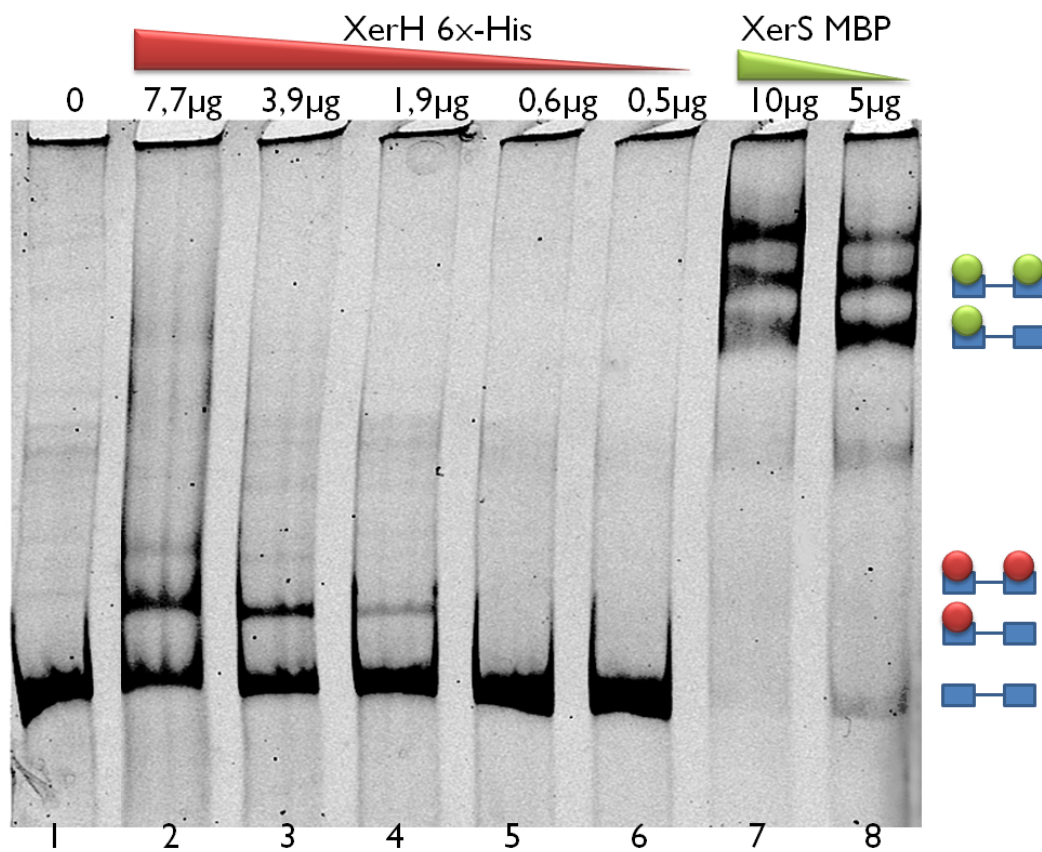
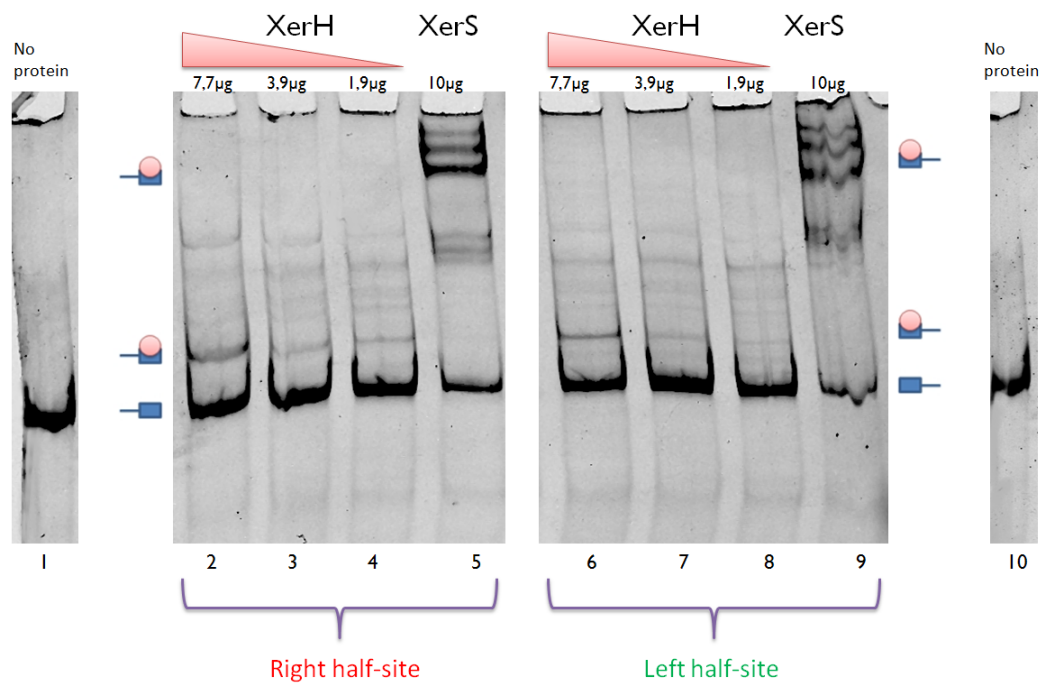


Figure 3.

A.

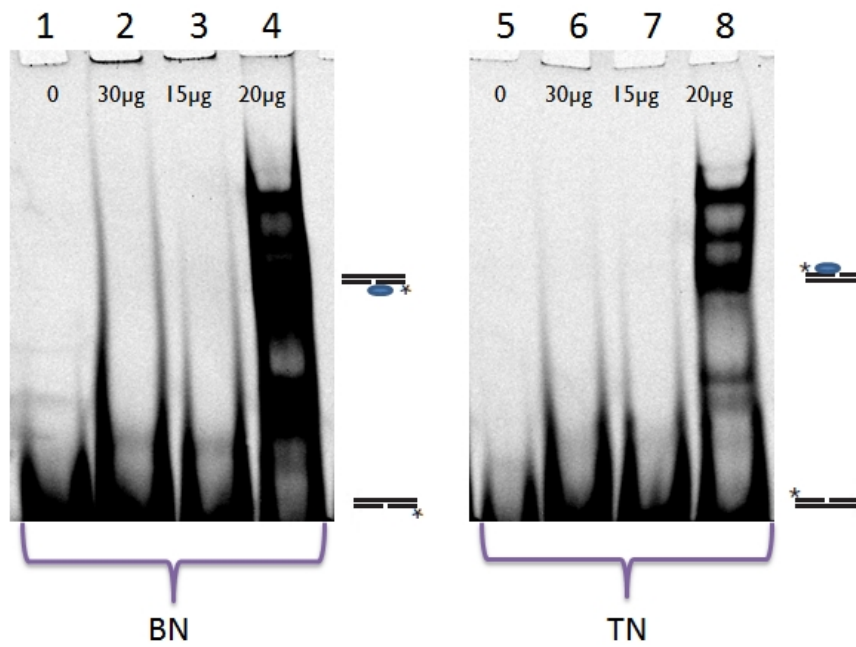


B.

<i>Streptococcus suis</i> (<i>dif_{SL}</i>)	ATTTTTCGAA	AAACTATAATT	TTCTTGAAA
<i>Campylobacter jejuni</i>	TTTTGTATTGA	AAACTGTAATT	TTCAAACCTT
Consensus sequence	-TT--T-----A	AAACT--A-TT	TTC-----

Figure 4.

A.



B.

ⒶTTTTC CGAAAACTATAATTTTCTTGAA
 TAAAAAGGCTTTTGTATATAAAGAACTⓉ

Chapitre III

Discussion

Les travaux de Carnoy et Roten (2009) ont permis de révéler la présence possible d'un nouveau système de recombinaison *dif/Xer* chez un sous-groupe d' ϵ -protéobactéries pathogènes. Nous avons été en mesure de montrer que les acteurs de ce système, XerH, *dif_H* et FtsK, présentent des similarités mécanistiques et structurelles significatives avec le seul système de recombinaison *dif/Xer* à une seule recombinase étudié extensivement à ce jour, *dif_{SL}/XerS* des *Streptococci* et *Lactococci*, si bien que ces conclusions et de nouvelles hypothèses ont pu être émises par rapport à ce système.

Le gène *xerH* et le site *dif_H* de *Campylobacter jejuni*, clonage et position dans le génome.

Le gène putatif identifié comme étant la recombinase Xer unique de *C. jejuni* et d'autres membres du sous-groupe des ϵ -protéobactéries codait pour une protéine de 354 aa avec un poids moléculaire de 41 kDa, selon les prédictions faites grâce à la base de données de biocyc.org. La protéine purifiée suite au clonage dans pQE30 (6xHis-tag) et passée sur SDS-PAGE fut bel et bien de cette taille (Figure 18).

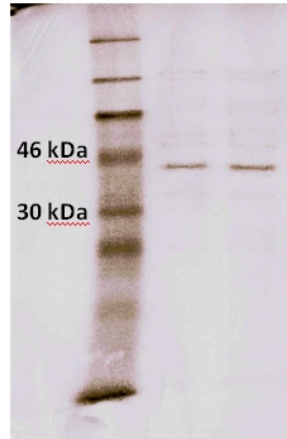


Figure 18. Gel SDS-PAGE 15% de purification de XerH. Le premier puits contient 25 µl de Prestained Protein marker, Broad Range (7-175 kDa) (NEB) ; les deux autres puits contiennent respectivement la première et la deuxième élution d'une purification de XerH 6xHis-tagged sur colonnes Ni-NTA (Qiagen).

Dans le génome de la souche qui a servi de modèle au clonage, on constate d'abord que XerH est décrite comme une recombinase XerD putative en raison de l'homologie entre les deux gènes (Carnoy et Roten 2009). Ensuite, on observe qu'elle est codée par le premier de trois gènes d'une même unité de transcription (figure 19).

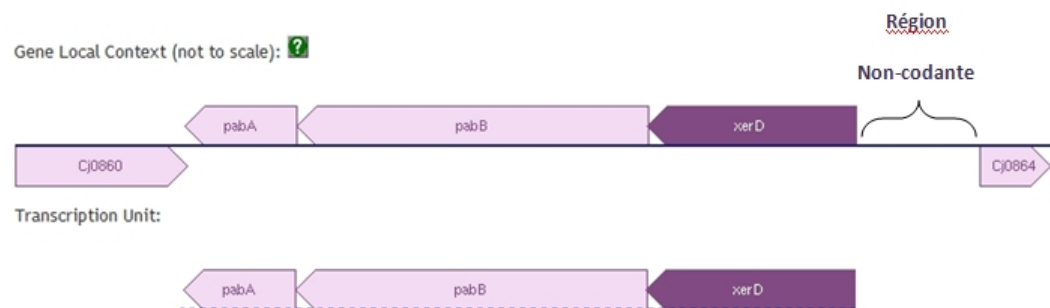


Figure 19. Contexte local et unité transcriptionnelle de XerH dans *C. jejuni* NCTC 11168. Les flèches indiquent le sens de la transcription. XerH n'étant pas officiellement reconnu, le gène de la recombinase porte le nom de la tyrosine recombinase à laquelle il s'apparente le plus (XerD) (base de données de www.biocyc.org).

Les deux autres gènes sont *pabB* et *pabA* qui encodent les deux composantes d'une para-aminobenzoate synthase. Pour ce qui est d'autres souches de *Campylobacter*, la séquence de XerD demeure très bien conservée mais nous avons remarqué quelques différences dans la position et l'organisation des unités transcriptionnelles. Dans certaines des souches disponibles à ce jour, *xerH* est le seul gène de son unité. Dans d'autres souches, il partage son unité avec un ou deux gènes, souvent *pabA* et *pabB* mais aussi d'autres gènes.. Pour ce qui est des souches de *Helicobacter*, la variation est encore plus grande et il est intéressant de noter que le gène de la recombinase est parfois nommé *xerC* mais dans la majorité des cas il ne dispose pas de nom défini ce qui suggère que XerH, chez le genre *Helicobacter*, est plus atypique que chez *Campylobacter*. Nous avons déterminé (figure 20) à l'aide de l'outil LALIGN (<http://www.ch.embnet.org>) que XerH possède 22,4 % d'identité avec XerS et que les motifs YTH (site actif de la recombinaison (en bleu)) et RK se trouvent dans une région (domaine C-terminal) où plusieurs acides aminés sont conservés (Nolivos et *al.*, 2010). Avec l'outil JPRED (www.compbio.dundee.ac.uk), on obtient un degré de similarité de 83,4%.

```

      10      20      30      40      50
xerH 3 MKYPLDCEE-NFEKSFLEWLAKYVVKFLNLSLNKELKNPQALAEVNFALTKGVKNIDELD
      . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .
xerS  MRRELLLEKIDQLKEIMPWFV-----LEYYQSKLAVPYSFTTLYEYLKEYR
      10      20      30      40

      60      70      80      90      100     110
xerH 3 ALAKKARNAGLSGVNTYFNPLKVKFEYLNIFYKLYSLKQIDEELIVEVLASITGALSDASK
      . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .
xerS  RFFEWLQSDSLVAVERIADIPLDVLEHLTKKDMEAFILYLRERPLLNANTTQNGVSTTI
      50      60      70      80      90      100

      120     130     140     150     160     170
xerH 3 KNYRIAVINFFDFLDKQNEEDEKAHIFDINL-----KNWAGIAGSKGVKLPFMSKE
      . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .
xerS  NRILSALSSLFKYLTEEVENEQGEPYFYRNVMMKKVSTKKKKETLAARAENIKQKFLGDE
      110     120     130     140     150     160

      180     190     200     210     220
xerH 3 ELKKFLDAIEN-----ADFKNNTIRNKLIKIIIFTGIRVSEAINIKMGDISEE
      . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .
xerS  TME-FLDYVDKEYQVNLKRALSSSQKNERDLAILALLLAGVRLSEAVNLDLRDVNL-
      170     180     190     200     210     220

      230     240     250     260     270
xerH 3 NDLYIIRIRAKGNKYRVVMIKK-----ELIYDLLKNVSINYISKDALLFVNKKGTPLTQ
      . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .
xerS  -NMMIIEVTRKGGKRDSVNVAGFAKLYLEAYMGIRQQRYKAERTDTAFLSEYRGLP-NR
      230     240     250     260     270     280

      280     290     300     310     320     330
xerH 3 SYVSRIVEQLLFRAGIRKQKNGAHLRHTFATLLYKKQKDLVLVQEALGHASLNTSRIYT
      . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .
xerS  IDASSIEKMVAKYSADFKIRVTPHKLRLHLATRLYDATKSQVLVSHQLGHANTQVTDLYT
      290     300     310     320     330     340

      340     350
xerH 3 HFDNDKLLKLAQVAKELSDS
      . . . . . : . . . . .
xerS  HIVNDEQKNA-----LDQL
      350

```

Figure 20. Alignement des protéines XerH de *C. jejuni* et XerS de *S. suis*. L'alignement a été obtenu via l'outil LALIGN de <http://www.ch.embnet.org>. Les astérisques (*) représentent l'identité; les double points (:) représentent un haut degré de similarité alors que les points seuls (.) représentent moins de similarité entre les acides aminés.

Chez toutes les souches de *C.jejuni* testées, on observe une séquence non-codante d'environ 900 pb (figure 19) qui contient le site de recombinaison *dif_H*. Ceci correspond à la tendance observée chez le système XerS/*dif_{SL}*. En effet, le site *dif_{SL}* est également tout près du de gène *xerS*. Toutefois, la région non-

codante où se trouve le site n'est que d'environ 50 pb. Nous pensons que cela est dû plus à l'organisation intrinsèque du génome qu'à un quelconque évènement de transposition survenu durant l'évolution car rien ne l'indique dans les séquences adjacentes et la région est plutôt restreinte. En outre, le fait que le promoteur de la protéine soit aussi proche du site de liaison suggère une certaine forme d'autorégulation.

Par ailleurs, le clonage de *dif_H* fut fastidieux car non seulement il s'agit d'une séquence très courte mais elle se situe aussi dans une région très riche en A+T. Cela crée des difficultés quant à la synthèse d'oligonucléotides pour l'amplification. C'est à la toute fin de cette étude que le site fut cloné, ne nous donnant pas assez de temps pour effectuer des études de liaison et de clivage. Les tentatives de clonage du site dans pUC19 ayant échoué à plusieurs reprises, c'est finalement dans pTZ-PC, un plasmide dérivé de pTZ 19R mais qui contient deux sites XcmI, que *dif_H* a été introduit (Daniel Tessier, communication personnelle).

Expériences de liaison à l'ADN

Les similarités évidentes qui ont été trouvées entre les sites *dif_H* et *dif_{SL}* nous ont permis de supposer que XerH, par son homologie avec XerS était bel et bien une recombinase de type Xer et pouvait effectuer, à tout le moins en partie, une liaison spécifique à *dif_{SL}*. Nous avons été en mesure de confirmer cette hypothèse par des expériences de retard sur gel. Le premier constat fut qu'une liaison spécifique était bel et bien observable. Nous avons confirmé cette liaison en effectuant des réactions avec de l'ADN non-spécifique (données non-montrées) et pour lesquelles aucun retard n'a été observé. XerH et XerS ont une

taille comparable et leurs séquence est assez similaire, il est donc logique de s'attendre à une certaine polyvalence de leur activité sur des sites de recombinaison. Toutefois, la liaison de XerH demeure faible par rapport à celle de XerS car une grande partie de l'ADN demeure non lié dans ce que nous avons observé. De plus, la présence de retards plus haut causée par la liaison de plus d'une protéine au site de recombinaison n'est pas significative par rapport aux réactions contrôle de XerS dans les deux derniers puits. Ceci signifie que XerH est incapable de mener une liaison coopérative sur *dif_{SL}*. XerS est connue comme pouvant se lier aux deux parties de son site de recombinaison comme c'est le cas chez les systèmes à une seule tyrosine recombinase comme FLP ou Cre/*loxP* du plasmide P1 (Grindley et al., 2006 ; Nolivos et al., 2010). Cela pourrait être observé à des concentrations plus grandes de la protéine et demeure à voir. En effet, on constate une baisse rapide de la capacité de liaison dans le cas de quantités inférieures de protéine. La liaison coopérative n'est donc pas totalement à exclure dans le cas d'interactions entre XerH et *dif_{SL}* mais elle demeurerait faible. Toutefois, des expériences préliminaires effectuées après la fin du présent projet semblent montrer que XerH n'effectue pas de liaison coopérative avec son propre site de recombinaison, *dif_H* (Maxime Leroux, communication personnelle).

La zone à la frontière entre les bras de liaison et la région centrale révisée de *dif_{SL}* montre plusieurs nucléotides conservés avec *dif_H* ce qui laisse penser que c'est là l'endroit précis où le clivage a lieu (Leroux et al., 2011). Nous avons donc effectué des expériences de liaison aux demi-sites de *dif_{SL}* pour vérifier la force de liaison de XerH à l'un ou à l'autre des deux bras de *dif_{SL}* par

rapport à ce que XerS était capable de faire. Le constat fut que XerH ne se liait pas particulièrement bien à ni l'un ni l'autre de ses demi-sites mais un léger avantage semble observable chez le demi-site droit. Pour XerS ses expériences ont permis de prouver qu'un monomère se lie en priorité au demi-site gauche puis recrute un autre monomère pour lier ensuite le demi-site droit. Pour cette raison, la liaison au demi-site droit est généralement beaucoup plus faible qu'au demi-site gauche (Leroux et *al.*, 2011). Ceci met également en valeur la liaison coopérative de XerS sur son site. Comme XerH ne possède pas cette coopérativité sur *dif_{SL}*, il était à prévoir qu'il n'y aurait pas de grande différence en termes de force de liaison. Le léger avantage du site droit par rapport au site gauche, pourrait être dû au motif GAA du site gauche dont un seul nucléotide est conservé chez *dif_H* alors que le TTC, le motif correspondant sur le bras droit, est conservé (figure 21). Il est supposé que XerS se lie différemment aux deux bras du site de liaison à cause d'une asymétrie dans la séquence de *dif_{SL}* (ATTTTCCGAA (gauche)) (TTTCAAGAA (complément inversé droit)).

ATT <u>TTTCCGAA</u>	AAACTATAATT	<u>TTCTTGAAA</u>
TAAAAAGGCTT	TTTGATATTAA	<u>AAGAACTTT</u>

Figure 21. Site de recombinaison *dif_{SL}* double brin avec les répétitions inversées en surbrillance.

Le nucléotide supplémentaire avant GAA est soupçonné d'induire l'avantage de liaison du monomère au bras gauche (Leroux et *al.*, 2011). Par contre, pour XerH, il fallait garder en tête qu'avec un faible pouvoir de liaison, d'emblée, les différences entre les demi-sites de *dif_{SL}* et *dif_H* sont plus marquées. GAA est conservé au demi-site droit alors qu'il ne l'est que pour un nucléotide au

demi-site gauche. Nous pensons que ces trois nucléotides sont importants dans la liaison à *dif_{SL}* sur les deux brins. Les différences de nucléotides à cet endroit précis dans *dif_{SL}* par rapport à *dif_H* ne nous permettent pas de transposer ces résultats sur le système XerH/*dif_H*. Seule une analyse extensive de la liaison à *dif_H* avec des retards sur gels faits avec des demi-sites et des substrats suicide peut fournir des réponses sur la capacité de liaison sur un bras par rapport à l'autre.

Substrats suicide

Les substrats suicide permettent typiquement de vérifier indirectement la capacité de cliver l'ADN. Car avec les petites entailles faites sur le brin du haut (Top Nick, TN) ou le brin du bas (Bottom Nick, BN) de l'ADN, un clivage à quelques nucléotides en amont fait perdre une partie du brin, ce qui empêche la religation et forme un complexe covalent qui est détecté sur des gels dénaturants. XerS clive l'ADN et forme des complexes covalents plus nombreux lorsqu'en présence du brin BN. XerH n'a pu engendrer aucun retard significatif dans les conditions étudiées. Cela rendait alors impossible de poursuivre l'analyse quant à savoir où se situe la frontière entre l'espaceur et le bras de liaison pour XerH. Nous pensons que la faible affinité démontrée dans les expériences de liaison désavantage grandement XerH d'emblée, ce qui diminue encore plus les chances de pouvoir cliver l'ADN. Un ou deux nucléotides semblent critiques pour le clivage est leur conservation pose problème chez *dif_H*.

Hypothèses sur le mécanisme de cjFtsK

Les alignements entre ssFtsK et cjFtsK nous ont permis d'observer une grande homologie dans le domaine C-terminal et de suggérer que tout comme cela a été démontré pour XerS, le moteur de translocation de FtsK, les sous-domaines α et β sont nécessaires à l'activation de la recombinaison au même titre que le sous-domaine γ . Celui-ci est connu comme étant l'activateur dans tous les systèmes *Xer/dif* mais dans les systèmes à deux recombinases le moteur de translocation ne fait pas d'activation (Barre et al., 2000 ; Bigot et al., 2004 et Nolivos et al., 2010). Toutefois, cjFtsK demeure plus grande que ses homologues dans d'autres bactéries (figure 22). Comme nous avons pu le voir à l'aide de notre alignement avec ssFtsK (figure 5, chapitre 2), c'est surtout dans la partie N-terminale et le domaine «*linker*» que les différences existent. Il est difficile de tirer des conclusions de données bioinformatiques mais nous pouvons supposer que les longues séquences supplémentaires de cjFtsK sont importantes pour des fonctions qui ne sont pas impliquées dans la recombinaison *dif/Xer*. En effet, le domaine N-terminal ne participe pas à la translocation de l'ADN ni à l'activation de la recombinaison. Il est plutôt impliqué, grâce à ses quatre domaines transmembranaires dans l'ancrage à la membrane plasmique et la localisation de FtsK au septum (Dorazi et Dewar, 2000). Sachant que *C. jejuni* est une bactérie à gram négatif et morphologie spiralée il n'est pas exclus que son domaine N-terminal soit plus long pour garantir un meilleur ancrage. Toutefois, les séquences prédites d'hélices transmembranaires montrent en fait que *S. suis* posséderait cinq hélices transmembranaires alors que *C. jejuni* en aurait quatre dont seulement

trois sont très significatives (logiciel TMpred). Ceci démontre la nécessité d'effectuer une analyse approfondie de la structure de FtsK pour mieux comprendre sa répartition dans *C. jejuni* par rapport à *S. suis*.

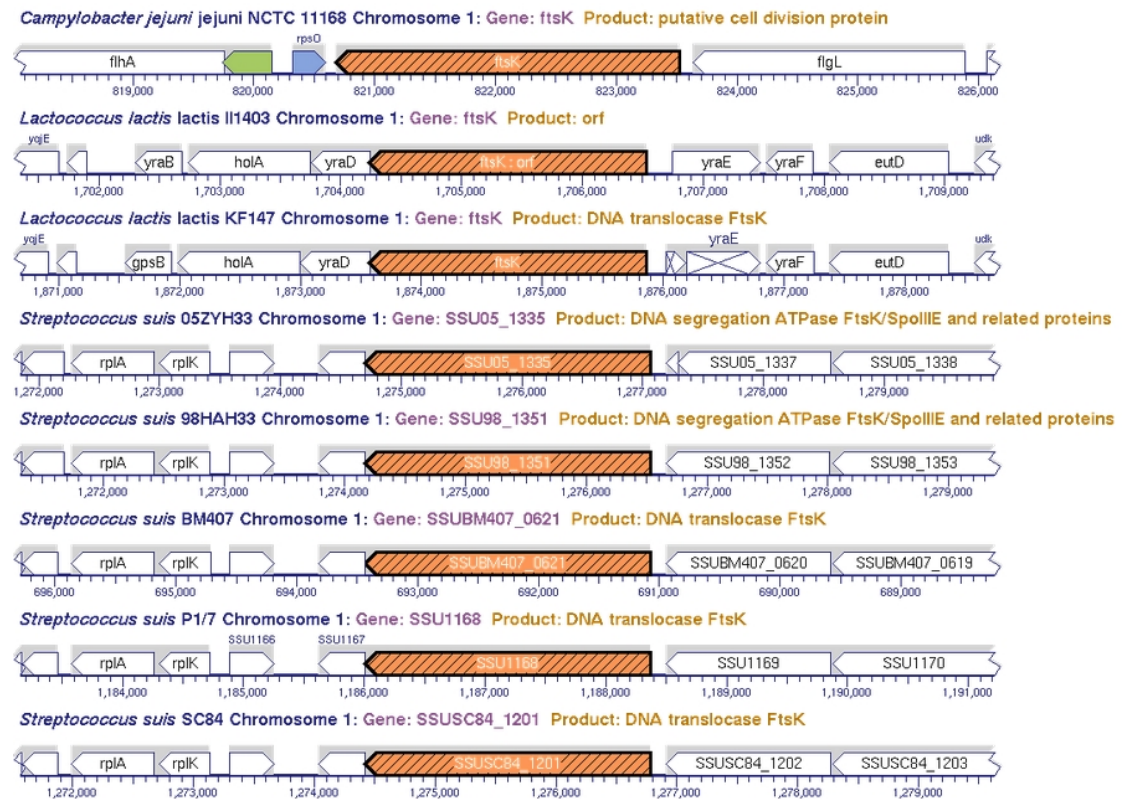


Figure 22. Alignement des des rgions du chromosome contenant *ftsK* de FtsK chez les bactéries ayant un système Xer à une seule recombinase. Alignement effectué à l'aide de la base de données de [www. Biocyc.org](http://www.Biocyc.org).

Le cas particulier de *Lactobacillus*

De récentes découvertes ont mis au jour la présence simultanée de deux systèmes de recombinaison Xer chez certains Firmicutes. Chez eux, les gènes de XerS et de XerCD sont tous les deux présents mais un site *dif_{SL}* n'a pu être trouvé. C'est là un surprenant exemple d'un intermédiaire évolutif possible avec la co-

existence de deux systèmes. Une hypothèse est que cette disposition résulterait d'un évènement de transfert de gène horizontal (Kono et *al.*, 2011). Ces nouvelles données nous laissent quelques pistes de réponse sur la manière dont les systèmes à une seule recombinase se sont répandus. Ils seraient peut-être des «sous-produits» du système *dif/XerCD* qui ont subis un transfert tôt durant l'évolution avant d'évoluer par eux-mêmes indépendamment. Cela pourrait avoir été causé par l'intégration de génome de phage dans *dif* ou bien d'un îlot de pathogénicité.

Autres expériences, perspectives et conclusion

Après la fin du présent projet, des expériences de retard sur gel ont été effectuées à l'aide du clone de *dif_H* pour établir la capacité de liaison de XerH à son site putatif et démontrent une liaison spécifique mais non coopérative (Maxime Leroux, communication personnelle). Ce résultat conduit à se demander s'il y a une priorité de liaison à un ou l'autre des bras du site de recombinaison pour le système *dif_H/XerH*. En effet, on sait que la liaison coopérative fait en sorte que la liaison se fait en priorité sur un bras de *dif* puis la recombinase liée facilite la liaison au deuxième bras. Beaucoup d'expériences restent à faire pour investiguer la liaison de XerH à son site natif.

La surprenante découverte d'une région centrale plus longue chez *dif_{SL}* (11pb par rapport à 6 à 8 dans les systèmes Xer déjà décrit) (Leroux et *al.*, 2011) laisse croire que *dif_H* pourrait également utiliser la même stratégie pour renforcer le lien entre la recombinase unique et le site de recombinaison au bras gauche d'abord puis au bras droit. Ainsi, des expériences sur des demi-sites de *dif_H*

pourraient donner une idée de la taille réelle de l'espace entre les bras du site. Aussi, il faut déterminer la polyvalence de XerS en effectuant des expériences de liaison et de clivage (à l'aide de substrat suicide) sur le site *dif_H*. Pour ce qui est de XerH, muter cette recombinaise demeure essentiel afin de comprendre son importance pour la bactérie à la morphologie atypique qu'est *C. jejuni*. Alors que chez les bacilles on observe des cellules en filaments et que les chaînes deviennent beaucoup plus longues chez les streptocoques lorsque le système est muté, qu'en est-il de *C. jejuni* dont la morphologie incurvée, les flagelles et le genre de mobilité atypique sont si importantes pour l'invasion de l'épithélium intestinal. Un mutant XerH entraînerait-il des dommages à la division cellulaire si grands que les cellules seraient difformes et moins invasives, voir non viables ? Aussi, la réponse SOS serait-elle capable de compenser pour son absence ? Dans un contexte de grande implication dans la santé publique de cette bactérie, le système XerH/*dif_H* pourrait se révéler essentiel dans sa pathogénécité. Muter le résidu tyrosine de la recombinaise aiderait à étudier l'étape de clivage chez *C. jejuni* tandis que remplacer complètement le gène par une cassette antibiotique par exemple peut révéler si ce gène est essentiel. Le cas échéant, il faudrait placer le gène sur un plasmide thermosensible ou inductible pour poursuivre d'autres expériences. Des expériences de complémentation effectuées tel que décrit dans Leroux et *al.*, (2011) confirmeraient l'influence de XerH sur la morphologie de la cellule de *C. jejuni*.

FtsK est essentielle à la mobilisation de l'ADN vers le septum pour initier la recombinaison site-spécifique et cloner ses domaines, le sous-domaine γ

de la partie C-terminale en particulier, et caractériser leurs fonctions par rapport à celles de FtsK de *S. suis*, entre autres, permettrait de mieux comprendre l'évolution de cette translocase chez le sous-groupe des ϵ -protéobactéries possédant le système XerH/*dif_H*. Aussi, cela pourrait nous en apprendre plus sur le mécanisme d'action de cette translocase comme les travaux de Nolivos et *al.*, (2010) l'ont montré. L'interaction entre XerH et FtsK étant attendue importante pour l'activation de la recombinaison, des expériences d'interaction protéine-protéine de type «*Pulldown*» aideraient à montrer les particularités de la relation entre ces deux acteurs de la recombinaison et déterminer les régions spécifiques de l'interaction. Une autre possibilité serait de lier directement le sous-domaine γ à XerH puis observer l'effet que cela aurait sur l'activation de la recombinaison.

Enfin, ce travail a apporté des éléments de réponse à quelques questions posées à propos du système de recombinaison *dif*/Xer atypique de *Campylobacter jejuni*. Toutefois, ce nouveau chapitre qui s'ouvre sur la recombinaison Xer reste largement à écrire. Les comparaisons avec XerS/*dif_{SL}* se poursuivront au fur et à mesure des découvertes sur l'un et l'autre de ces systèmes pour déterminer jusqu'à quel point ils sont interchangeables. La recombinaison site-spécifique est un mécanisme important pour les bactéries à chromosome circulaire et demeure peu connue dans de nombreux microorganismes atypiques. Les progrès des techniques de séquençage et d'études d'interactions protéine-protéine et ADN-protéine permettront à l'avenir de mieux comprendre la recombinaison site-spécifique et d'en élaborer un portrait global.

Références

- Abremski, K. E., and R. H. Hoess. "Evidence for a Second Conserved Arginine Residue in the Integrase Family of Recombination Proteins." *Protein Eng* 5, no. 1 (1992): 87-91.
- Alen, C., D. J. Sherratt, and S. D. Colloms. "Direct Interaction of Aminopeptidase a with Recombination Site DNA in Xer Site-Specific Recombination." *EMBO J* 16, no. 17 (1997): 5188-97.
- Allos, B. M. "Association between *Campylobacter* Infection and Guillain-Barre Syndrome." *J Infect Dis* 176 Suppl 2, (1997): S125-8.
- Allos, B. M. "*Campylobacter jejuni* Infections: Update on Emerging Issues and Trends." *Clin Infect Dis* 32, no. 8 (2001): 1201-6.
- Altekruse, S. F., N. J. Stern, P. I. Fields, and D. L. Swerdlow. "*Campylobacter jejuni*--an Emerging Foodborne Pathogen." *Emerg Infect Dis* 5, no. 1 (1999): 28-35.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. "Basic Local Alignment Search Tool." *J Mol Biol* 215, no. 3 (1990): 403-10.
- Amundsen, S. K., and G. R. Smith. "Interchangeable Parts of the *Escherichia coli* Recombination Machinery." *Cell* 112, no. 6 (2003): 741-4.
- Arciszewska, L. K., R. A. Baker, B. Hallet, and D. J. Sherratt. "Coordinated Control of XerC and XerD Catalytic Activities During Holliday Junction Resolution." *J Mol Biol* 299, no. 2 (2000): 391-403.
- Arciszewska, L. K., and D. J. Sherratt. "Xer Site-Specific Recombination in Vitro." *EMBO J* 14, no. 9 (1995): 2112-20.
- Argos, P., A. Landy, K. Abremski, J. B. Egan, E. Haggard-Ljungquist, R. H. Hoess, M. L. Kahn, B. Kalionis, S. V. Narayana, L. S. Pierson, 3rd, and et al. "The Integrase Family of Site-Specific Recombinases: Regional Similarities and Global Diversity." *EMBO J* 5, no. 2 (1986): 433-40.

Aussel, L., F. X. Barre, M. Aroyo, A. Stasiak, A. Z. Stasiak, and D. Sherratt. "FtsK Is a DNA Motor Protein That Activates Chromosome Dimer Resolution by Switching the Catalytic State of the XerC and XerD Recombinases." *Cell* 108, no. 2 (2002): 195-205.

Barre, F. X., M. Aroyo, S. D. Colloms, A. Helfrich, F. Cornet, and D. J. Sherratt. "FtsK Functions in the Processing of a Holliday Junction Intermediate During Bacterial Chromosome Segregation." *Genes Dev* 14, no. 23 (2000): 2976-88.

Barre, F. X., B. Soballe, B. Michel, M. Aroyo, M. Robertson, and D. Sherratt. "Circles: The Replication-Recombination-Chromosome Segregation Connection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, no. 15 (2001): 8189-95.

Bartling, D., and E. W. Weiler. "Leucine Aminopeptidase from *Arabidopsis Thaliana*. Molecular Evidence for a Phylogenetically Conserved Enzyme of Protein Turnover in Higher Plants." *Eur J Biochem* 205, no. 1 (1992): 425-31.

Bigot, S., J. Corre, J. M. Louarn, F. Cornet, and F. X. Barre. "FtsK Activities in Xer Recombination, DNA Mobilization and Cell Division Involve Overlapping and Separate Domains of the Protein." *Mol Microbiol* 54, no. 4 (2004): 876-86.

Bigot, S., O. A. Saleh, F. Cornet, J. F. Allemand, and F. X. Barre. "Oriented Loading of FtsK on KOPS." *Nat Struct Mol Biol* 13, no. 11 (2006): 1026-8.

Bigot, S., O. A. Saleh, C. Lesterlin, C. Pages, M. El Karoui, C. Dennis, M. Grigoriev, J. F. Allemand, F. X. Barre, and F. Cornet. "KOPS: DNA Motifs That Control *E. Coli* Chromosome Segregation by Orienting the FtsK Translocase." *EMBO J* 24, no. 21 (2005): 3770-80.

Biller, S. J., and W. F. Burkholder. "The *Bacillus Subtilis* Sfta (Ytps) and SpoIIIE DNA Translocases Play Distinct Roles in Growing Cells to Ensure Faithful Chromosome Partitioning." *Mol Microbiol* 74, no. 4 (2009): 790-809.

Blakely, G., S. Colloms, G. May, M. Burke, and D. Sherratt. "*Escherichia coli* XerC Recombinase Is Required for Chromosomal Segregation at Cell Division." *New Biol* 3, no. 8 (1991): 789-98.

Blakely, G., G. May, R. McCulloch, L. K. Arciszewska, M. Burke, S. T. Lovett, and D. J. Sherratt. "Two Related Recombinases Are Required for Site-Specific Recombination at *Dif* and *Cer* in *E. Coli* K12." *Cell* 75, no. 2 (1993): 351-61.

Blakely, G. W., A. O. Davidson, and D. J. Sherratt. "Sequential Strand Exchange by XerC and XerD During Site-Specific Recombination at *Dif*." *J Biol Chem* 275, no. 14 (2000): 9930-6.

Bolotin, A., P. Wincker, S. Mauger, O. Jaillon, K. Malmarmé, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich, and A. Sorokin. "The Complete Genome Sequence of the Lactic Acid Bacterium *Lactococcus Lactis* Ssp. *Lactis* II1403." *Genome Res* 11, no. 5 (2001): 731-53.

Bregu, M., D. J. Sherratt, and S. D. Colloms. "Accessory Factors Determine the Order of Strand Exchange in Xer Recombination at *psi*." *EMBO J* 21, no. 14 (2002): 3888-97.

Burley, S. K., P. R. David, R. M. Sweet, A. Taylor, and W. N. Lipscomb. "Structure Determination and Refinement of Bovine Lens Leucine Aminopeptidase and Its Complex with Bestatin." *J Mol Biol* 224, no. 1 (1992): 113-40.

Cao, Y., and F. Hayes. "A Newly Identified, Essential Catalytic Residue in a Critical Secondary Structure Element in the Integrase Family of Site-Specific Recombinases Is Conserved in a Similar Element in Eucaryotic Type Ib Topoisomerases." *J Mol Biol* 289, no. 3 (1999): 517-27.

Capiaux, H., F. Cornet, J. Corre, M. I. Guijo, K. Peral, J. E. Rebollo, and J. M. Louarn. "Polarization of the *Escherichia coli* Chromosome. A View from the Terminus." *Biochimie* 83, no. 2 (2001): 161-70.

Chaconas, G., P. E. Stewart, K. Tilly, J. L. Bono, and P. Rosa. "Telomere Resolution in the Lyme Disease Spirochete." *EMBO J* 20, no. 12 (2001): 3229-37.

Chalker, A. F., A. Lupas, K. Ingraham, C. Y. So, R. D. Lunsford, T. Li, A. Bryant, D. J. Holmes, A. Marra, S. C. Pearson, J. Ray, M. K. Burnham, L. M. Palmer, S. Biswas, and M. Zalacain. "Genetic Characterization of Gram-Positive Homologs of the XerCD Site-Specific Recombinases." *J Mol Microbiol Biotechnol* 2, no. 2 (2000): 225-33.

Champoux, J. J. "DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism." *Annu Rev Biochem* 70, (2001): 369-413.

Chen, J. C., and J. Beckwith. "FtsQ, FtsL and FtsI Require FtsK, but Not FtsN, for Co-Localization with FtsZ During *Escherichia coli* Cell Division." *Mol Microbiol* 42, no. 2 (2001): 395-413.

Chen, Y., U. Narendra, L. E. Iype, M. M. Cox, and P. A. Rice. "Crystal Structure of a Flp Recombinase-Holliday Junction Complex: Assembly of an Active Oligomer by Helix Swapping." *Mol Cell* 6, no. 4 (2000): 885-97.

Cheng, C., P. Kussie, N. Pavletich, and S. Shuman. "Conservation of Structure and Mechanism between Eukaryotic Topoisomerase I and Site-Specific Recombinases." *Cell* 92, no. 6 (1998): 841-50.

Clerget, M. "Site-Specific Recombination Promoted by a Short DNA Segment of Plasmid R1 and by a Homologous Segment in the Terminus Region of the *Escherichia coli* Chromosome." *New Biol* 3, no. 8 (1991): 780-8.

Coates, C. J., J. M. Kaminski, J. B. Summers, D. J. Segal, A. D. Miller, and A. F. Kolb. "Site-Directed Genome Modification: Derivatives of DNA-Modifying Enzymes as Targeting Tools." *Trends Biotechnol* 23, no. 8 (2005): 407-19.

Colloms, S. D., J. Bath, and D. J. Sherratt. "Topological Selectivity in Xer Site-Specific Recombination." *Cell* 88, no. 6 (1997): 855-64.

Colloms, S. D., R. McCulloch, K. Grant, L. Neilson, and D. J. Sherratt. "Xer-Mediated Site-Specific Recombination in Vitro." *EMBO J* 15, no. 5 (1996): 1172-81.

Colloms, S. D., P. Sykora, G. Szatmari, and D. J. Sherratt. "Recombination at Cole1 Cer Requires the *Escherichia coli* XerC Gene Product, a Member of the Lambda Integrase Family of Site-Specific Recombinases." *J Bacteriol* 172, no. 12 (1990): 6973-80.

Cornet, F., B. Hallet, and D. J. Sherratt. "Xer Recombination in *Escherichia coli*. Site-Specific DNA Topoisomerase Activity of the XerC and XerD Recombinases." *J Biol Chem* 272, no. 35 (1997): 21927-31.

Cornet, F., I. Mortier, J. Patte, and J. M. Louarn. "Plasmid Psc101 Harbors a Recombination Site, psi, Which Is Able to Resolve Plasmid Multimers and to

Substitute for the Analogous Chromosomal *Escherichia coli* Site *Dif*." *J Bacteriol* 176, no. 11 (1994): 3188-95.

Cortez, D., S. Quevillon-Cheruel, S. Gribaldo, N. Desnoues, G. Sezonov, P. Forterre, and M. C. Serre. "Evidence for a *Xer/dif* System for Chromosome Resolution in Archaea." *PLoS Genet* 6, no. 10 (2010): e1001166.

Cox, M. M., M. F. Goodman, K. N. Kreuzer, D. J. Sherratt, S. J. Sandler, and K. J. Marians. "The Importance of Repairing Stalled Replication Forks." *Nature* 404, no. 6773 (2000): 37-41.

Cromie, G. A., and D. R. Leach. "Control of Crossing Over." *Mol Cell* 6, no. 4 (2000): 815-26.

Crozat, E., A. Meglio, J. F. Allemand, C. E. Chivers, M. Howarth, C. Venien-Bryan, I. Grainge, and D. J. Sherratt. "Separating Speed and Ability to Displace Roadblocks During DNA Translocation by FtsK." *EMBO J* 29, no. 8 (2010): 1423-33.

Cuypers, H. T., L. A. van Loon-Klaassen, W. T. Egberts, W. W. de Jong, and H. Bloemendal. "The Primary Structure of Leucine Aminopeptidase from Bovine Eye Lens." *J Biol Chem* 257, no. 12 (1982): 7077-85.

Dekkers, L. C., C. C. Phoelich, L. van der Fits, and B. J. Lugtenberg. "A Site-Specific Recombinase Is Required for Competitive Root Colonization by *Pseudomonas Fluorescens* Wcs365." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, no. 12 (1998): 7051-6.

Deneke, J., G. Ziegelin, R. Lurz, and E. Lanka. "The Protelomerase of Temperate *Escherichia coli* Phage N15 Has Cleaving-Joining Activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, no. 14 (2000): 7721-6.

Dorazi, R., and S. J. Dewar. "Membrane Topology of the N-Terminus of the *Escherichia coli* FtsK Division Protein." *FEBS Lett* 478, no. 1-2 (2000): 13-8.

Draper, G. C., N. McLennan, K. Begg, M. Masters, and W. D. Donachie. "Only the N-Terminal Domain of FtsK Functions in Cell Division." *J Bacteriol* 180, no. 17 (1998): 4621-7.

Dubarry, N., and F. X. Barre. "Fully Efficient Chromosome Dimer Resolution in *Escherichia coli* Cells Lacking the Integral Membrane Domain of FtsK." *EMBO J* 29, no. 3 (2010): 597-605.

Duggin, I. G., N. Dubarry, and S. D. Bell. "Replication Termination and Chromosome Dimer Resolution in the Archaeon *Sulfolobus Solfataricus*." *EMBO J* 30, no. 1 (2011): 145-53.

Eucker, T. P., and M. E. Konkel. "The Cooperative Action of Bacterial Fibronectin-Binding Proteins and Secreted Proteins Promote Maximal *Campylobacter jejuni* Invasion of Host Cells by Stimulating Membrane Ruffling." *Cell Microbiol*, (2011).

Finer, Kim and John J. Finer. 2002. *Normal and Abnormal Cell Division of Agrobacterium tumefaciens*. Visual Resources. American Society for Microbiology, Washington, DC. www.microbelibrary.org modifié le 10 September 2010. Consulté le 30 octobre 2011.

Gopaul, D. N., F. Guo, and G. D. Van Duyne. "Structure of the Holliday Junction Intermediate in Cre-LoxP Site-Specific Recombination." *EMBO J* 17, no. 14 (1998): 4175-87.

Graham, J. E., D. J. Sherratt, and M. D. Szczelkun. "Sequence-Specific Assembly of FtsK Hexamers Establishes Directional Translocation on DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, no. 47 (2010): 20263-8.

Graham, J. E., V. Sivanathan, D. J. Sherratt, and L. K. Arciszewska. "FtsK Translocation on DNA Stops at XerCd-Dif." *Nucleic Acids Res* 38, no. 1 (2010): 72-81.

Grainge, I., and M. Jayaram. "The Integrase Family of Recombinase: Organization and Function of the Active Site." *Mol Microbiol* 33, no. 3 (1999): 449-56.

Grindley, N. D., K. L. Whiteson, and P. A. Rice. "Mechanisms of Site-Specific Recombination." *Annu Rev Biochem* 75, (2006): 567-605.

Guerry, P. "*Campylobacter* Flagella: Not Just for Motility." [In eng]. *Trends Microbiol* 15, no. 10 (Oct 2007): 456-61.

Guo, F., D. N. Gopaul, and G. D. van Duyne. "Structure of Cre Recombinase Complexed with DNA in a Site-Specific Recombination Synapse." *Nature* 389, no. 6646 (1997): 40-6.

Guo, F., D. N. Gopaul, and G. D. van Duyne. "Asymmetric DNA Bending in the Cre-LoxP Site-Specific Recombination Synapse." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, no. 13 (1999): 7143-8.

Hadden, R. D., D. R. Cornblath, R. A. Hughes, J. Zielasek, H. P. Hartung, K. V. Toyka, and A. V. Swan. "Electrophysiological Classification of Guillain-Barre Syndrome: Clinical Associations and Outcome. Plasma Exchange/Sandoglobulin Guillain-Barre Syndrome Trial Group." *Ann Neurol* 44, no. 5 (1998): 780-8.

Hall, R. M., and C. Vockler. "The Region of the Incn Plasmid R46 Coding for Resistance to Beta-Lactam Antibiotics, Streptomycin/Spectinomycin and Sulphonamides Is Closely Related to Antibiotic Resistance Segments Found in Incw Plasmids and in Tn21-Like Transposons." *Nucleic Acids Res* 15, no. 18 (1987): 7491-501.

Hallet, B., L. K. Arciszewska, and D. J. Sherratt. "Reciprocal Control of Catalysis by the Tyrosine Recombinases XerC and XerD: An Enzymatic Switch in Site-Specific Recombination." *Mol Cell* 4, no. 6 (1999): 949-59.

Hayes, F., S. A. Lubetzki, and D. J. Sherratt. "*Salmonella Typhimurium* Specifies a Circular Chromosome Dimer Resolution System Which Is Homologous to the Xer Site-Specific Recombination System of *Escherichia coli*." *Gene* 198, no. 1-2 (1997): 105-10.

Hayes, F., and D. J. Sherratt. "Recombinase Binding Specificity at the Chromosome Dimer Resolution Site *Dif* of *Escherichia coli*." *J Mol Biol* 266, no. 3 (1997): 525-37.

Henz, S. R., D. H. Huson, A. F. Auch, K. Nieselt-Struwe, and S. C. Schuster. "Whole-Genome Prokaryotic Phylogeny." *Bioinformatics* 21, no. 10 (2005): 2329-35.

Hickman, A. B., S. Waninger, J. J. Scocca, and F. Dyda. "Molecular Organization in Site-Specific Recombination: The Catalytic Domain of Bacteriophage Hp1 Integrase at 2.7 Å Resolution." *Cell* 89, no. 2 (1997): 227-37.

Hirano, N., T. Muroi, H. Takahashi, and M. Haruki. "Site-Specific Recombinases as Tools for Heterologous Gene Integration." *Appl Microbiol Biotechnol* 92, no. 2 (2011): 227-39.

Hoess, R., K. Abremski, S. Irwin, M. Kendall, and A. Mack. "DNA Specificity of the Cre Recombinase Resides in the 25 KDa Carboxyl Domain of the Protein." *J Mol Biol* 216, no. 4 (1990): 873-82.

Ip, S. C., M. Bregu, F. X. Barre, and D. J. Sherratt. "Decatenation of DNA Circles by FtsK-Dependent Xer Site-Specific Recombination." *EMBO J* 22, no. 23 (2003): 6399-407.

Jouan, L., and G. Szatmari. "Interactions of the *Caulobacter Crescentus* XerC and XerD Recombinases with the *E. Coli Dif* Site." *FEMS Microbiol Lett* 222, no. 2 (2003): 257-62.

Kennedy, S. P., F. Chevalier, and F. X. Barre. "Delayed Activation of Xer Recombination at *Dif* by FtsK During Septum Assembly in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* 68, no. 4 (2008): 1018-28.

Kersulyte, D., W. Lee, D. Subramaniam, S. Anant, P. Herrera, L. Cabrera, J. Balqui, O. Barabas, A. Kalia, R. H. Gilman, and D. E. Berg. "*Helicobacter Pylori*'s Plasticity Zones Are Novel Transposable Elements." *PLoS One* 4, no. 9 (2009): e6859.

Klemm, P. "Two Regulatory *Fim* Genes, *Fimb* and *Fime*, Control the Phase Variation of Type 1 Fimbriae in *Escherichia coli*." *EMBO J* 5, no. 6 (1986): 1389-93.

Kolb, A. F. "Genome Engineering Using Site-Specific Recombinases." *Cloning Stem Cells* 4, no. 1 (2002): 65-80.

Kono, N., K. Arakawa, and M. Tomita. "Comprehensive Prediction of Chromosome Dimer Resolution Sites in Bacterial Genomes." *BMC Genomics* 12, (2011): 19.

Kuempel, P. L., J. M. Henson, L. Dircks, M. Tecklenburg, and D. F. Lim. "*Dif*, a RecA-Independent Recombination Site in the Terminus Region of the Chromosome of *Escherichia coli*." *New Biol* 3, no. 8 (1991): 799-811.

Kuzminov, A. "Collapse and Repair of Replication Forks in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* 16, no. 3 (1995): 373-84.

Kwon, H. J., R. Tirumalai, A. Landy, and T. Ellenberger. "Flexibility in DNA Recombination: Structure of the Lambda Integrase Catalytic Core." *Science* 276, no. 5309 (1997): 126-31.

LaGier, Michael, D. Threadgill and E. Pratt. 2008. *Scanning Electron Micrograph of Campylobacter jejuni*. Visual resources. American Society for Microbiology, Washington, DC. www.microbelibrary.org. Consulté le 30 octobre 2011.

Landy, A. "Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Site-Specific Recombination." *Annu Rev Biochem* 58, (1989): 913-49.

Le Bourgeois, P., M. Bugarel, N. Campo, M. L. Daveran-Mingot, J. Labonte, D. Lanfranchi, T. Lautier, C. Pages, and P. Ritzenthaler. "The Unconventional Xer Recombination Machinery of *Streptococci/Lactococci*." *PLoS Genet* 3, no. 7 (2007): e117.

Leroux, M., F. Jia, and G. Szatmari. "Characterization of the *Streptococcus Suis* XerS Recombinase and Its Unconventional Cleavage of the *Dif* Site." *FEMS Microbiol Lett* 324, no. 2 (2011): 135-41.

Leslie, N. R., and D. J. Sherratt. "Site-Specific Recombination in the Replication Terminus Region of *Escherichia coli*: Functional Replacement of *Dif*." *EMBO J* 14, no. 7 (1995): 1561-70.

Lesterlin, C., F. X. Barre, and F. Cornet. "Genetic Recombination and the Cell Cycle: What We Have Learned from Chromosome Dimers." *Mol Microbiol* 54, no. 5 (2004): 1151-60.

Levy, O., J. L. Ptacin, P. J. Pease, J. Gore, M. B. Eisen, C. Bustamante, and N. R. Cozzarelli. "Identification of Oligonucleotide Sequences That Direct the Movement of the *Escherichia coli* FtsK Translocase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, no. 49 (2005): 17618-23.

Li, W., S. Kamtekar, Y. Xiong, G. J. Sarkis, N. D. Grindley, and T. A. Steitz. "Structure of a Synaptic Gammadelta Resolvase Tetramer Covalently Linked to Two Cleaved DnNAs." *Science* 309, no. 5738 (2005): 1210-5.

Liu, G., G. C. Draper, and W. D. Donachie. "FtsK Is a Bifunctional Protein Involved in Cell Division and Chromosome Localization in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* 29, no. 3 (1998): 893-903.

Lovett, S. T., and R. D. Kolodner. "Nucleotide Sequence of the *Escherichia coli* RecJ Chromosomal Region and Construction of RecJ-Overexpression Plasmids." *J Bacteriol* 173, no. 1 (1991): 353-64.

Lowe, J., A. Ellonen, M. D. Allen, C. Atkinson, D. J. Sherratt, and I. Grainge. "Molecular Mechanism of Sequence-Directed DNA Loading and Translocation by FtsK." *Mol Cell* 31, no. 4 (2008): 498-509.

Makarova, K. S., and E. V. Koonin. "Evolutionary Genomics of Lactic Acid Bacteria." *J Bacteriol* 189, no. 4 (2007): 1199-208.

Marshall Stark, W., M. R. Boocock, F. J. Olorunniji, and S. J. Rowland. "Intermediates in Serine Recombinase-Mediated Site-Specific Recombination." *Biochem Soc Trans* 39, no. 2 (2011): 617-22.

Massey, T. H., C. P. Mercogliano, J. Yates, D. J. Sherratt, and J. Lowe. "Double-Stranded DNA Translocation: Structure and Mechanism of Hexameric FtsK." *Mol Cell* 23, no. 4 (2006): 457-69.

Michel, B., G. D. Recchia, M. Penel-Colin, S. D. Ehrlich, and D. J. Sherratt. "Resolution of Holliday Junctions by Ruvabc Prevents Dimer Formation in Rep Mutants and Uv-Irradiated Cells." *Mol Microbiol* 37, no. 1 (2000): 180-91.

Missiakas, D., C. Georgopoulos, and S. Raina. "The *Escherichia coli* Dsbc (Xpra) Gene Encodes a Periplasmic Protein Involved in Disulfide Bond Formation." *EMBO J* 13, no. 8 (1994): 2013-20.

Neilson, L., G. Blakely, and D. J. Sherratt. "Site-Specific Recombination at *Dif* by *Haemophilus Influenzae* XerC." *Mol Microbiol* 31, no. 3 (1999): 915-26.

Noe, L., and G. Kucherov. "Yass: Enhancing the Sensitivity of DNA Similarity Search." *Nucleic Acids Res* 33, no. Web Server issue (2005): W540-3.

Nolivos, S., C. Pages, P. Rousseau, P. Le Bourgeois, and F. Cornet. "Are Two Better Than One? Analysis of an FtsK/Xer Recombination System That Uses a Single Recombinase." *Nucleic Acids Res* 38, no. 19 (2010): 6477-89.

Nunes-Duby, S. E., H. J. Kwon, R. S. Tirumalai, T. Ellenberger, and A. Landy. "Similarities and Differences among 105 Members of the Int Family of Site-Specific Recombinases." *Nucleic Acids Res* 26, no. 2 (1998): 391-406.

Panigrahi, G. B., L. G. Beatty, and P. D. Sadowski. "The Flp Protein Contacts Both Major and Minor Grooves of Its Recognition Target Sequence." *Nucleic Acids Res* 20, no. 22 (1992): 5927-35.

Panigrahi, G. B., and P. D. Sadowski. "Interaction of the N_h2- and C_{oo}-Terminal Domains of the Flp Recombinase with the Flp Recognition Target Sequence." *J Biol Chem* 269, no. 14 (1994): 10940-5.

Pargellis, C. A., S. E. Nunes-Duby, L. M. de Vargas, and A. Landy. "Suicide Recombination Substrates Yield Covalent Lambda Integrase-DNA Complexes and Lead to Identification of the Active Site Tyrosine." *J Biol Chem* 263, no. 16 (1988): 7678-85.

Parkhill, J., B. W. Wren, K. Mungall, J. M. Ketley, C. Churcher, D. Basham, T. Chillingworth, R. M. Davies, T. Feltwell, S. Holroyd, K. Jagels, A. V. Karlyshev, S. Moule, M. J. Pallen, C. W. Penn, M. A. Quail, M. A. Rajandream, K. M. Rutherford, A. H. van Vliet, S. Whitehead, and B. G. Barrell. "The Genome Sequence of the Food-Borne Pathogen *Campylobacter jejuni* Reveals Hypervariable Sequences." *Nature* 403, no. 6770 (2000): 665-8.

Pease, P. J., O. Levy, G. J. Cost, J. Gore, J. L. Ptacin, D. Sherratt, C. Bustamante, and N. R. Cozzarelli. "Sequence-Directed DNA Translocation by Purified FtsK." *Science* 307, no. 5709 (2005): 586-90.

Perals, K., H. Capiiaux, J. B. Vincourt, J. M. Louarn, D. J. Sherratt, and F. Cornet. "Interplay between Recombination, Cell Division and Chromosome Structure During Chromosome Dimer Resolution in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* 39, no. 4 (2001): 904-13.

Perals, K., F. Cornet, Y. Merlet, I. Delon, and J. M. Louarn. "Functional Polarization of the *Escherichia coli* Chromosome Terminus: The *Dif* Site Acts in Chromosome Dimer Resolution Only When Located between Long Stretches of Opposite Polarity." *Mol Microbiol* 36, no. 1 (2000): 33-43.

Poulter, R. T., and T. J. Goodwin. "Difs-1 and the Other Tyrosine Recombinase Retrotransposons." *Cytogenet Genome Res* 110, no. 1-4 (2005): 575-88.

Radman-Livaja, M., T. Biswas, T. Ellenberger, A. Landy, and H. Aihara. "DNA Arms Do the Legwork to Ensure the Directionality of Lambda Site-Specific Recombination." *Curr Opin Struct Biol* 16, no. 1 (2006): 42-50.

Recchia, G. D., M. Aroyo, D. Wolf, G. Blakely, and D. J. Sherratt. "FtsK-Dependent and -Independent Pathways of Xer Site-Specific Recombination." *EMBO J* 18, no. 20 (1999): 5724-34.

Recchia, G. D., and D. J. Sherratt. "Conservation of Xer Site-Specific Recombination Genes in Bacteria." *Mol Microbiol* 34, no. 5 (1999): 1146-8.

Reed, R. R., and N. D. Grindley. "Transposon-Mediated Site-Specific Recombination *in Vitro*: DNA Cleavage and Protein-DNA Linkage at the Recombination Site." *Cell* 25, no. 3 (1981): 721-8.

Reed, R. R., and C. D. Moser. "Resolvase-Mediated Recombination Intermediates Contain a Serine Residue Covalently Linked to DNA." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 49, (1984): 245-9.

Rice, P. A. "Resolving Integral Questions in Site-Specific Recombination." *Nat Struct Mol Biol* 12, no. 8 (2005): 641-3.

Ruiz-Palacios, G. M. "The Health Burden of *Campylobacter* Infection and the Impact of Antimicrobial Resistance: Playing Chicken." *Clin Infect Dis* 44, no. 5 (2007): 701-3.

Saitou, N., and M. Nei. "The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees." *Mol Biol Evol* 4, no. 4 (1987): 406-25.

Saleh, O. A., S. Bigot, F. X. Barre, and J. F. Allemand. "Analysis of DNA Supercoil Induction by FtsK Indicates Translocation without Groove-Tracking." *Nat Struct Mol Biol* 12, no. 5 (2005): 436-40.

Saleh, O. A., C. Perals, F. X. Barre, and J. F. Allemand. "Fast, DNA-Sequence Independent Translocation by FtsK in a Single-Molecule Experiment." *EMBO J* 23, no. 12 (2004): 2430-9.

Salzberg, S. L., A. J. Salzberg, A. R. Kerlavage, and J. F. Tomb. "Skewed Oligomers and Origins of Replication." *Gene* 217, no. 1-2 (1998): 57-67.

Sciochetti, S. A., P. J. Piggot, and G. W. Blakely. "Identification and Characterization of the *Dif* Site from *Bacillus Subtilis*." *J Bacteriol* 183, no. 3 (2001): 1058-68.

Senechal, H., J. Delesques, and G. Szatmari. "*Escherichia coli* Argr Mutants Defective in Cer/Xer Recombination, but Not in DNA Binding." *FEMS Microbiol Lett* 305, no. 2 (2010): 162-9.

Sharma, A., R. Hanai, and A. Mondragon. "Crystal Structure of the Amino-Terminal Fragment of *Vaccinia* Virus DNA Topoisomerase I at 1.6 Å Resolution." *Structure* 2, no. 8 (1994): 767-77.

Sherratt, D. J. "Bacterial Chromosome Dynamics." *Science* 301, no. 5634 (2003): 780-5.

Sherratt, D. J., L. K. Arciszewska, G. Blakely, S. Colloms, K. Grant, N. Leslie, and R. McCulloch. "Site-Specific Recombination and Circular Chromosome Segregation." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 347, no. 1319 (1995): 37-42.

Sherratt, D. J., B. Soballe, F. X. Barre, S. Filipe, I. Lau, T. Massey, and J. Yates. "Recombination and Chromosome Segregation." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359, no. 1441 (2004): 61-9.

Sivanathan, V., M. D. Allen, C. de Bekker, R. Baker, L. K. Arciszewska, S. M. Freund, M. Bycroft, J. Lowe, and D. J. Sherratt. "The FtsK Gamma Domain Directs Oriented DNA Translocation by Interacting with KOPS." *Nat Struct Mol Biol* 13, no. 11 (2006): 965-72.

Sivanathan, V., J. E. Emerson, C. Pages, F. Cornet, D. J. Sherratt, and L. K. Arciszewska. "Kops-Guided DNA Translocation by FtsK Safeguards *Escherichia coli* Chromosome Segregation." *Mol Microbiol* 71, no. 4 (2009): 1031-42.

Smith, M. C., and H. M. Thorpe. "Diversity in the Serine Recombinases." *Mol Microbiol* 44, no. 2 (2002): 299-307.

Spiers, A. J., and D. J. Sherratt. "C-Terminal Interactions between the XerC and XerD Site-Specific Recombinases." *Mol Microbiol* 32, no. 5 (1999): 1031-42.

Stark, W. M., D. J. Sherratt, and M. R. Boocock. "Site-Specific Recombination by Tn3 Resolvase: Topological Changes in the Forward and Reverse Reactions." *Cell* 58, no. 4 (1989): 779-90.

Steiner, W., G. Liu, W. D. Donachie, and P. Kuempel. "The Cytoplasmic Domain of FtsK Protein Is Required for Resolution of Chromosome Dimers." *Mol Microbiol* 31, no. 2 (1999): 579-83.

Stirling, C. J., S. D. Colloms, J. F. Collins, G. Szatmari, and D. J. Sherratt. "Xerb, an *Escherichia coli* Gene Required for Plasmid Cole1 Site-Specific Recombination, Is Identical to Pepa, Encoding Aminopeptidase a, a Protein with Substantial Similarity to Bovine Lens Leucine Aminopeptidase." *EMBO J* 8, no. 5 (1989): 1623-7.

Stirling, C. J., G. Szatmari, G. Stewart, M. C. Smith, and D. J. Sherratt. "The Arginine Repressor Is Essential for Plasmid-Stabilizing Site-Specific Recombination at the Cole1 Cer Locus." *EMBO J* 7, no. 13 (1988): 4389-95.

Strater, N., D. J. Sherratt, and S. D. Colloms. "X-Ray Structure of Aminopeptidase a from *Escherichia coli* and a Model for the Nucleoprotein Complex in Xer Site-Specific Recombination." *EMBO J* 18, no. 16 (1999): 4513-22.

Subramanya, H. S., L. K. Arciszewska, R. A. Baker, L. E. Bird, D. J. Sherratt, and D. B. Wigley. "Crystal Structure of the Site-Specific Recombinase, XerD." *EMBO J* 16, no. 17 (1997): 5178-87.

Summers, D. K., and D. J. Sherratt. "Multimerization of High Copy Number Plasmids Causes Instability: Coie1 Encodes a Determinant Essential for Plasmid Monomerization and Stability." *Cell* 36, no. 4 (1984): 1097-103.

Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. "Mega4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Mega) Software Version 4.0." *Mol Biol Evol* 24, no. 8 (2007): 1596-9.

Tecklenburg, M., A. Naumer, O. Nagappan, and P. Kuempel. "The *Dif* Resolvase Locus of the *Escherichia coli* Chromosome Can Be Replaced by a 33-Bp Sequence, but Function Depends on Location." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, no. 5 (1995): 1352-6.

Tian, G., D. Lim, J. Carey, and W. K. Maas. "Binding of the Arginine Repressor of *Escherichia coli* K12 to Its Operator Sites." *J Mol Biol* 226, no. 2 (1992): 387-97.

Val, M. E., M. Bouvier, J. Campos, D. Sherratt, F. Cornet, D. Mazel, and F. X. Barre. "The Single-Stranded Genome of Phage Ctx Is the Form Used for Integration into the Genome of *Vibrio Cholerae*." *Mol Cell* 19, no. 4 (2005): 559-66.

Van Duyne, G. D. "A Structural View of Cre-LoxP Site-Specific Recombination." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30, (2001): 87-104.

van Gool, A. J., N. M. Hajibagheri, A. Stasiak, and S. C. West. "Assembly of the *Escherichia Coli* Ruvabc Resolvasome Directs the Orientation of Holliday Junction Resolution." *Genes Dev* 13, no. 14 (1999): 1861-70.

Villion, M., and G. Szatmari. "Cloning and Characterisation of the *Proteus Mirabilis* XerD Gene." *FEMS Microbiol Lett* 164, no. 1 (1998): 83-90.

Villion, M., and G. Szatmari. "The XerC Recombinase of *Proteus Mirabilis*: Characterization and Interaction with Other Tyrosine Recombinases." *FEMS Microbiol Lett* 226, no. 1 (2003): 65-71.

Wood, D. O., M. J. Solomon, and R. R. Speed. "Characterization of the *Rickettsia Prowazekii* Pepa Gene Encoding Leucine Aminopeptidase." *J Bacteriol* 175, no. 1 (1993): 159-65.

Yates, J., I. Zhekov, R. Baker, B. Eklund, D. J. Sherratt, and L. K. Arciszewska. "Dissection of a Functional Interaction between the DNA Translocase, FtsK, and the XerD Recombinase." *Mol Microbiol* 59, no. 6 (2006): 1754-66.

Young, K. T., L. M. Davis, and V. J. Dirita. "*Campylobacter Jejuni*: Molecular Biology and Pathogenesis." *Nat Rev Microbiol* 5, no. 9 (2007): 665-79.

Yu, X. C., E. K. Weihe, and W. Margolin. "Role of the C Terminus of FtsK in *Escherichia Coli* Chromosome Segregation." *J Bacteriol* 180, no. 23 (1998): 6424-8.

Remerciements

Je voudrais remercier Dr George Szatmari de m'avoir permis d'intégrer son laboratoire, de m'avoir soutenue, encouragée et guidée tout au long de mes études. Je garderai toujours en mémoire l'atmosphère joviale dans laquelle son laboratoire baignait, il y est pour beaucoup.

Un grand merci à mes collègues au laboratoire dont Maxime Leroux, Alexandra Gustinelli et Gina Ugaz. Ils m'ont aidée et conseillée judicieusement. Leur présence et leur gentillesse dans les bons comme dans les mauvais moments ont sans aucun doute fait une différence dans le succès de mes études graduées. Je tiens également à remercier Dr Charles M. Dozois de m'avoir permis d'effectuer une transition en douceur pour la continuation de mes études.

Sans le soutien et l'amour inconditionnel de mes parents Razika Tachouche et Ali Rezoug je n'aurais pu traverser les épreuves qui ont pavé mon parcours. Aussi, j'ai une pensée toute spéciale et émue envers ceux et celles qui m'ont inspirée le goût de réussir par les études. Ceux qui ne sont plus parmi nous, notamment Zhor Belhager, matriarce Rezoug, et ceux qui sont très loin d'ici mais qui n'en sont pas moins fiers de cet accomplissement. Je remercie infiniment ma grande et belle famille.

